



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Isolamento, identificação e caracterização  
enzimática de uma bactéria de fonte termal do  
Cerrado

TIAGO BENOLIEL ROCHA

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes  
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Torres

Brasília, DF  
2010



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Isolamento, identificação e caracterização  
enzimática de uma bactéria de fonte termal do  
Cerrado

TIAGO BENOLIEL ROCHA

Brasília, DF  
2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Isolamento, identificação e caracterização  
enzimática de uma bactéria de fonte termal do  
Cerrado

TIAGO BENOLIEL ROCHA

**Dissertação apresentada ao Departamento de  
Biologia Celular do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade de Brasília como  
requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em  
Biologia Molecular.**

Brasília, DF  
2010

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

**Co-orientador:** Prof<sup>º</sup> Dr. Fernando Araripe Torres

**Banca Examinadora:**

- ✓ Prof<sup>ª</sup> Dra. Marlene Teixeira de Souza, Dept<sup>º</sup> de Biologia Celular, Universidade de Brasília.
- ✓ Prof<sup>ª</sup> Dra. Betânia Ferraz Quirino, Dept<sup>º</sup> de Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília.

## **Agradecimentos**

Às professoras da banca, agradeço pelo aceite em compor a minha banca e pelo tempo que vocês dispensaram à leitura e correção do meu trabalho.

À professora Cynthia que sempre me ajudou nos momentos mais complicados.

Aos professores Marcelo Brígido e Andréa, por me incentivarem durante a graduação e pelo apoio durante o mestrado.

Ao professor Fernando Araripe que sempre discutiu e propôs idéias fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradecimento especial à professora Lídia, por “adotar-me” como aluno e permitir o desenvolvimento desse trabalho de acordo com as minhas idéias, estando sempre disposta para conversar sobre assuntos de trabalho ou não. Eu sei que não deve ter sido fácil me agüentar (principalmente quando eu sumia...), mas, graças ao seu apoio, eu consegui finalizar com êxito essa etapa da minha vida, obrigado.

Aos colegas do Lab 1, Lab 3, Lab 4 e da enzimologia, pelos bons momentos, pelos nem tão bons assim e pelo companheirismo, fundamental para que a ciência “funcione” no Brasil.

Aos amigos de grupo: Ju, Teyssa, Karem, Janice, Carol, Vinícios, Bia, Louise e Osmar, pelo apoio e por todos os momentos nas “Masmorras”.

Ao Rafael Gaúcho, pela descontração e conversas atravessadas pelos corredores.

À Vivis, a pessoa que mais ajudou a me situar no laboratório e sempre esteve presente pra resolver os problemas do dia-a-dia.

A toda a galera do Pódion, especialmente ao Pablo e ao Jonatas pelo companheirismo e amizade.

Ao Du e ao Charles, pelos momentos de alegria e descontração nos corredores da UnB (e no clube também, quando matávamos aula...)

Ao meu grande amigo Mikael, sempre presente nas “fuleragens” e nas noites viradas no laboratório fermentando bactérias. Valeu cara, seu apoio foi fundamental.

À minha querida Nessinha, por me agüentar tanto tempo falando em ciências malucas e, mesmo assim, sempre acreditar em mim e levar jantares nos dias de fermentação. Você é mais do que especial.

Ao meu querido irmão Bruno, responsável pelo início desse projeto. Agradeço pelo exemplo, pelo apoio, pela ajuda. Passamos a conviver mais no laboratório do que em casa, e por todas as conversas e idéias malucas (geralmente discutidas na cozinha...), muito obrigado, eu não teria conseguido sem você.

À minha irmã Sabrina, que, apesar de não entender nada do que eu faço, sempre me ajudou com conversas, conselhos e às vezes dinheiro.... Um dia eu te pago de volta!!

À Carmé que sempre cuidou de mim, independente do que acontecesse, eu devo muito desde trabalho a você.

À vovó Suze que, além do apoio financeiro, sempre me ajudou.

Aos meus pais que, apesar da minha ausência domiciliar durante este trabalho, nunca deixaram de acreditar em mim e são os grandes responsáveis pelo meu sucesso. Muito obrigado, eu amo demais vocês,

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	VIII
<b>ABSTRACT</b>	IX
<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1. Diversidade Microbiana	2
2. Microrganismos de Fontes Termais	4
3. Gênero <i>Bacillus</i>	5
4. Biotecnologia e Conversão de Biomassa	7
5. Estrutura e Composição da Parede Celular Vegetal	9
6. Enzimas Celulolíticas	10
7. Enzimas Xilanolíticas	12
8. Aplicações Biotecnológicas de Celulases e Xilanases	14
<b>OBJETIVOS</b>	18
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	20
<b>MATERIAL</b>	21
1. Considerações Gerais	21
2. Marcadores de tamanho para DNA	21
3. Marcador de peso molecular de proteínas	21
4. Oligonucleotídeos sintéticos	21
	IV

5. Meios de Cultura	22
6. Soluções	24
<b>MÉTODOS</b>	32
7. Coleta e isolamento das bactérias	32
8. Coloração de Gram	32
9. Seleção de atividade enzimática em placa de Petri	33
10. Seleção por temperatura de crescimento	33
11. Coloração para visualização de endósporos	34
12. Extração do DNA genômico da estirpe FT9	34
13. Análise de ácidos nucleicos em gel de agarose	35
14. Reação de polimerização em cadeia (PCR)	35
14.1. <i>Locus</i> gênico do RNA ribossomal 16S	35
14.2. <i>Locus</i> gênico da subunidade $\beta$ da RNA polimerase	36
15. Purificação dos produtos de PCR	36
16. Sequenciamento dos produtos de PCR	37
17. Análise das sequências de DNA	37
17.1. Sequência do <i>locus</i> gênico do RNA ribossomal 16S	37
17.2. Sequência do <i>locus</i> gênico da subunidade $\beta$ da RNA polimerase	38

18. Hemólise em meio ágar sangue	39
19. Determinação da concentração ótima de fonte de nitrogênio	39
20. Cultivo do <i>Bacillus sp.</i> FT9 em diferentes fontes de carbono	40
21. Contagem de células viáveis	41
22. Dosagem de substrato na cultura – Método da hidrólise ácida	41
23. Dosagem de açúcar redutor – Método do ácido dinitrosalicílico (DNS)	42
24. Dosagem de Proteínas – Método de Bradford	42
25. Cálculo da taxa de crescimento e dos rendimentos de fermentação	42
26. Ensaio enzimáticos com os sobrenadantes das culturas	43
27. Efeito do pH sobre a atividade das enzimas	43
28. Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas	44
29. Termoestabilidade enzimática	44
30. Análise de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante	45
<b>RESULTADOS</b>	47
<b>1. Coleta e Seleção</b>	48
1.1. Coloração de Gram	49
1.2. Seleção por atividade enzimática	51
1.3. Seleção por temperatura de crescimento	52

<b>2. Identificação</b>	57
2.1. Análises do <i>locus</i> gênico que codifica o rRNA 16S	57
2.2. Análises do <i>locus</i> gênico que codifica subunidade $\beta$ da RNA polimerase	61
<b>3. Caracterização do Perfil Enzimático</b>	65
3.1. Cultivos em diferentes fontes de carbono	65
3.2. Ensaio enzimáticos com os sobrenadantes das culturas de <i>Bacillus sp.</i> FT9	70
3.3. Determinação de temperatura e pH ótimos de atividade e estabilidade térmica das enzimas	75
3.4. Caracterização do perfil de secreção do <i>Bacillus sp.</i> FT9 em diferentes substratos	79
<b>DISCUSSÃO</b>	81
1. Biodiversidade das fontes termais	82
2. Classificação e filogenia molecular	84
3. Caracterização enzimática	87
4. Perspectivas	92
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	93

## RESUMO

Fontes hidrotermais possuem grande diversidade de microrganismos termo resistentes, que são importantes para as indústrias de conversão de biomassa vegetal. A lignocelulose é o componente mais abundante da biomassa, mas é subutilizado pela indisponibilidade de enzimas de baixo custo que realizem a degradação com eficiência. Neste trabalho, treze bactérias foram isoladas da água de duas fontes termais do Parque Nacional de Caldas Novas, GO. Uma foi selecionada para ser identificada e caracterizada enzimaticamente por suportar a maior temperatura de crescimento e deter maior atividade em placa contra carboximetilcelulose (CMC), celulose ultracristalina (UCel) e xilana. Após análises das sequências gênicas do RNA ribossomal 16S e da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, a bactéria selecionada foi classificada no grupo do *Bacillus cereus*, mas não foi possível a diferenciação entre o *B. cereus* e o *B. thuringiensis*, sendo denominada como *Bacillus sp.* linhagem FT9. Após a classificação, o *Bacillus sp.* FT9 foi cultivado em CMC, UCel, xilana *oat spelts* (XOS), xilana *birchwood* (XBW) e glicose. Para os substratos complexos, a maior taxa de crescimento específico e os mais elevados rendimentos de indução foram encontrados nas culturas induzidas com XOS, sendo observada atividade de xilanase no sobrenadante dessa cultura igual a 0,537 UI/mL a 50 °C e pH 6,0. No sobrenadante da cultura induzida em CMC, foi encontrada atividade de CMCase e FTPase igual a 0,231 UI/mL e 0,111 UI/mL a 70 °C e pH 7,0, respectivamente. Esse é o primeiro relato de atividade xilanolítica e o segundo de atividade celulolítica para linhagens relacionadas filogeneticamente com o grupo do *B. cereus*.

## ABSTRACT

Microorganisms from hot springs play an important role at the biomass conversion industries. Lignocellulose is the major component of vegetal biomass, however, it is underused because of the unavailability of cost-effective enzymes that perform efficiently its degradation. In this work, thirteen bacteria were isolated from two hot springs located at Caldas Novas National Park, Brazil. One of them was selected for identification and enzymatic description due to the highest grown temperature and the greatest cellulase and xylanase activity that it shown at preliminary assays. When its rDNA 16S and RNA polymerase's  $\beta$  subunit sequences were analyzed, the chosen strain presented close phylogeny to *Bacillus cereus* group, although species classification has not been possible through these techniques, it was named *Bacillus sp.* strain FT9. Then, it was grown on carboxymethylcellulose (CMC), ultracrystalline cellulose (UCel), xylan oat spelts, xylan birchwood and glucose. Considering the complex substrates, the highest rates of specific grown and yields were found at fermentation on XOS, which had 0,537 UI/mL of xylanase activity at 50 °C and pH 6,0. On CMC grown cultures, 0,231 UI/mL of CMCase activity and 0,111 UI/mL of FTPase were detected, both at 70 °C and pH 7,0. That is the first work describing xylanase activity and the second one to describe cellulase activity at *Bacillus cereus* close related species.

# *Introdução*

# INTRODUÇÃO

---

## 1. Diversidade Microbiana

Os microrganismos são a maior fonte da diversidade de genes e enzimas do nosso planeta. Estes são responsáveis pela geração da energia primária, pelos ciclos biogeoquímicos e representam a parte mais abundante de organismos vivos em termos de biomassa total, quantidade de células (Beloqui *et al.*, 2008) e diversidade de espécies (McHardy and Rigoutsos, 2007, Ward *et al.*, 2008). Não obstante sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (Pace, 2009).

A maior parte dos estudos relacionados com o uso sustentável da biodiversidade tem sido focada em macrorganismos (vertebrados e plantas), entretanto, estima-se que quase 90% das espécies do planeta são de invertebrados e microrganismos, que têm um papel fundamental no equilíbrio dos ecossistemas (Crawford, 2005).

A taxonomia de microrganismos classicamente é baseada na morfologia (como forma, cor, tamanho, arranjo, entre outros) e fisiologia (utilização de diferentes substratos, produção de proteínas específicas, reprodução, etc.) das espécies, considerando também as interações ecológicas e o habitat de cada organismo (Bergey *et al.*, 1984). Mas com a evolução de técnicas que permitem a classificação considerando o parentesco evolutivo das espécies, a sistemática de microrganismos tem sofrido muitas mudanças nos últimos anos (Vos, 2009). A principal ferramenta adotada nas últimas décadas como um parâmetro para a classificação de organismos tem sido o *locus* gênico que codifica o RNA da menor subunidade ribossomal, cuja sequência é muito conservada nos indivíduos da mesma espécie e, em geral, apresenta sítios de polimorfismo quando comparada com a sequência de outras espécies (revisto por Rajendhran and Gunasekaran, 2010). Esta técnica pode ser aplicada em organismos que

## INTRODUÇÃO

---

não são cultiváveis, o que possibilitou o estudo da biodiversidade de microrganismos e a expansão dos projetos de metagenoma, que baseia-se no estudo das sequências de DNA presentes em amostras retiradas do ambiente, como água ou solo, não sendo necessário o cultivo dos respectivos organismos. (revisto por Tuffin *et al.*, 2009).

A quantidade de seqüências de rRNA 16S depositadas em bancos de dados públicos tem crescido de modo acelerado em virtude do aparecimento de novas tecnologias de seqüenciamento de DNA, como o pirosequenciamento (Margulies *et al.*, 2005). Os projetos de metagenoma receberam um grande impulso destas tecnologias (Petrosino *et al.*, 2009), e estimou-se que em 1g de solo há entre 20 e 40 mil espécies de bactérias (Trevors, 2010). Levando-se em consideração que são descritas cerca de 5.000 espécies de bactérias, cuja maioria não é de solo, acredita-se que menos de 1% dos procariotos do planeta sejam conhecidos (Lozupone and Knight, 2007, Xu J., 2006).

Nas últimas décadas tem se observado que microrganismos podem ser encontrados em praticamente todos os ecossistemas da biosfera, como regiões vulcânicas continentais (Stout *et al.*, 2009), profundidades oceânicas (Dick and Tebo, 2010, Scheckenbach *et al.*, 2010), geleiras na Antártida (Cary *et al.*, 2010, Pearce *et al.*, 2010, Teixeira *et al.*, 2010) e fontes termais continentais distribuídas por todo o mundo (Saha *et al.*, 2010, Song *et al.*, 2010, Vick *et al.*, 2010), embora o cultivo de tais organismos ainda seja fastidioso para a microbiologia.

## 2. Microrganismos de Fontes Termiais

De toda a diversidade de microrganismos existentes, um fenótipo não monofilético define um grupo de organismos único na natureza, a capacidade de crescer em altas temperaturas. Não há um consenso quanto ao limite mínimo de temperatura de crescimento para classificar um organismo como termofílico, mas de maneira geral, são organismos que crescem em temperaturas acima de 60 °C ou 70 °C.

Uma das principais fontes de microrganismos termofílicos são as águas termais oceânicas, próximas a fendas vulcânicas e as fontes termais continentais, como os gêiseres do parque norte americano de Yellowstone. Muitos estudos vêm sendo realizados nestes ambientes visando à avaliação da sua biodiversidade e do potencial biotecnológico dos microrganismos (de Buron and Morand, 2004, Dick and Tebo, 2010, Hamilton-Brehm *et al.*, 2010, Stout *et al.*, 2009), embora a maior parte das bactérias de fontes termais não seja cultivável *in vitro* (Burton and Norris, 2000, Vesteynsdottir *et al.*, 2010).

No Brasil existem várias fontes termais distribuídas por todo o seu território. O complexo hidrotermal mais famoso, e considerado a maior reserva hidrotermal de origem não vulcânica do mundo, localiza-se na cidade goiana de Caldas Novas, no centro do Cerrado Brasileiro. A teoria Geológica é a mais aceita para formação das águas termais dessa região, em que, provavelmente, a profundidade atingida pelo lençol freático proporcione o aquecimento das águas que surgem na superfície com temperaturas de até 60 °C (Campos, 2005). Nenhum estudo relativo à biodiversidade destas águas foi realizado até a presente data.

Os organismos termofílicos são de grande interesse para a indústria, já que vários processos precisam ser realizados a altas temperaturas e a utilização de células e

# INTRODUÇÃO

---

enzimas que resistam a tais condições diminui muito o custo de produção (Blumer-Schuette *et al.*, 2008). A capacidade de crescer em celulose cristalina e em biomassa não tratada, também, tem chamado a atenção para alguns termófilos, como o *Caldicellulosiruptor bescii* (Kataeva *et al.*, 2009, Yang S. J. *et al.*, 2009), que teve os genes de duas celulasas e duas xilanases clonados e expressos em *E. coli*, que passou a ser capaz de crescer em meios de cultura contendo celulose microcristalina ou xilana como única fonte de carbono (Bolshakova *et al.*, 1994).

Entre a microbiota comumente encontrada em fontes termais, estão presentes representantes do domínio *Archea* e do domínio *Bacteria* (Nunoura *et al.*, 2010, Simbahan *et al.*, 2004). Entre os diversos gêneros de Arqueas descritos, os gêneros *Pyrococcus* e *Thermococcus* têm lugar de destaque nas indústrias de biotecnologia, com diversas enzimas termorresistentes descritas (Andronopoulou and Vorgias, 2004, Kang and Ishikawa, 2007, Kim H. W. *et al.*, 2008). Dentro do domínio *Bacteria*, o gênero *Thermus* ficou reconhecido como o principal produtor de enzimas termoresistentes com utilização laboratorial, como a Taq DNA polimerase usada nas reações de PCR (Gibbs *et al.*, 2009). Mas o gênero de bactérias mais conhecido, comumente encontrado em fontes termais e com inúmeras aplicações biotecnológicas é o gênero *Bacillus* (Adiguzel *et al.*, 2009, Asoodeh *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2008).

### **3. Gênero *Bacillus***

O gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*) é composto atualmente por mais de 200 espécies que apresentam a forma de bacilo, se coram como Gram positivo (em culturas no início da fase logarítmica de crescimento, o resultado da coloração de Gram pode ser variável), com endósporos, aeróbios ou facultativos e, frequentemente, catalase

## INTRODUÇÃO

---

positivos. São bactérias ubíquas em vários ecossistemas, mas geralmente encontradas na microbiota do solo (Harwood, 1989). Tradicionalmente, esse gênero é dividido em três grupos de acordo com a morfologia do esporo: o grupo I é composto por bactérias Gram positivas, com endósporo esférico ou ovóide, na posição central ou terminal, que não deforma o esporângio (por exemplo, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, e outros); o grupo II é constituído por espécies com Gram variável, endósporo ovóide, central ou terminal que deforma o esporângio (*B. circulans*, *B. stearothermophilus* e outros); e o grupo III é formado por espécies que apresentam endósporo esférico, terminal ou subterminal que deforma o esporângio (*B. globisporus*, *B. insolitus*, etc.) (Fritze, 2004, Lamanna, 1940).

A heterogeneidade tanto genética quanto fisiológica do gênero *Bacillus* levou a comunidade científica a rever as relações filogenéticas nesse grupo desde o início da década de 1990 (Ash and Collins, 1992, Ash *et al.*, 1991, Farrow *et al.*, 1992). Durante esses anos, espécies que eram consideradas do gênero *Bacillus* foram reclassificadas em mais de dez diferentes gêneros, como *Geobacillus* e *Paenibacillus* (Murray and Baron, 2007b), e ainda há divergências quanto à classificação de algumas delas (Helgason *et al.*, 2000).

Ecologicamente, os *Bacillus* possuem um nicho fundamental para a manutenção dos ciclos biogeoquímicos, pois a maior parte das espécies descritas participa de processos de decomposição de matéria orgânica. Algumas espécies podem realizar relações ecológicas interespecíficas com mamíferos e outros animais (Earl *et al.*, 2008, Van Elsas *et al.*, 1978), como o *B. anthracis*, o agente causador do carbúnculo hemático ou antraz (uma doença aguda e geralmente fatal em muitas espécies de mamíferos, inclusive no homem), e o *B. cereus*, que pode causar intoxicações alimentares. Há também o *B. thuringiensis*, conhecido por sintetizar proteínas cristais biologicamente

# INTRODUÇÃO

---

ativas contra a larva de alguns insetos e possui uma ampla aplicação na indústria agrícola (Hugh-Jones and Blackburn, 2009, Vilas-Boas *et al.*, 2007).

O gênero *Bacillus* é o grupo de maior importância biotecnológica e aplicação industrial dentro do domínio *Bacteria*. A espécie modelo do grupo é o *B. subtilis*, que possui várias linhagens selvagens, laboratoriais e industriais. Aplicações dessa espécie estão presentes em diversos ramos comerciais tanto com utilização direta dos organismos (Bais *et al.*, 2004), quanto com a utilização de produtos, como enzimas (Rasmussen *et al.*, 2010) e antibióticos (Stein, 2005).

Em particular, a utilização de espécies do gênero *Bacillus* na indústria de conversão de biomassa tem chamado a atenção. Inúmeras enzimas hidrolíticas desse gênero vêm sendo caracterizadas, entre elas xilanases (Nagar *et al.*, 2010, Yoon, 2009), celulases (Li *et al.*, 2009, Rastogi *et al.*, 2009, Romero-Garcia *et al.*, 2009) e amilases (Asoodeh *et al.*, 2010, Bano *et al.*, 2009, Hmidet *et al.*, 2010), com algumas já sendo utilizadas em larga escala nos processos de bioconversão (Maki *et al.*, 2009).

## **4. Biotecnologia e Conversão de Biomassa**

A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final do melhor candidato a partir de uma lista reduzida de opções e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (Bull *et al.*, 2000).

No escopo das aplicações microbianas em biotecnologia tradicional, o valor dos microrganismos é geralmente avaliado pela potencial aplicação direta nos processos

## INTRODUÇÃO

---

biotecnológicos ou valor de mercado dos produtos. O valor indireto dos produtos biotecnológicos baseados em processos microbianos, contudo, é raramente contemplado, tal como: benefícios ambientais e sociais decorrentes do tratamento de resíduos industriais e poluição ambiental (Faith and Walker, 2002, Shoo, 2010).

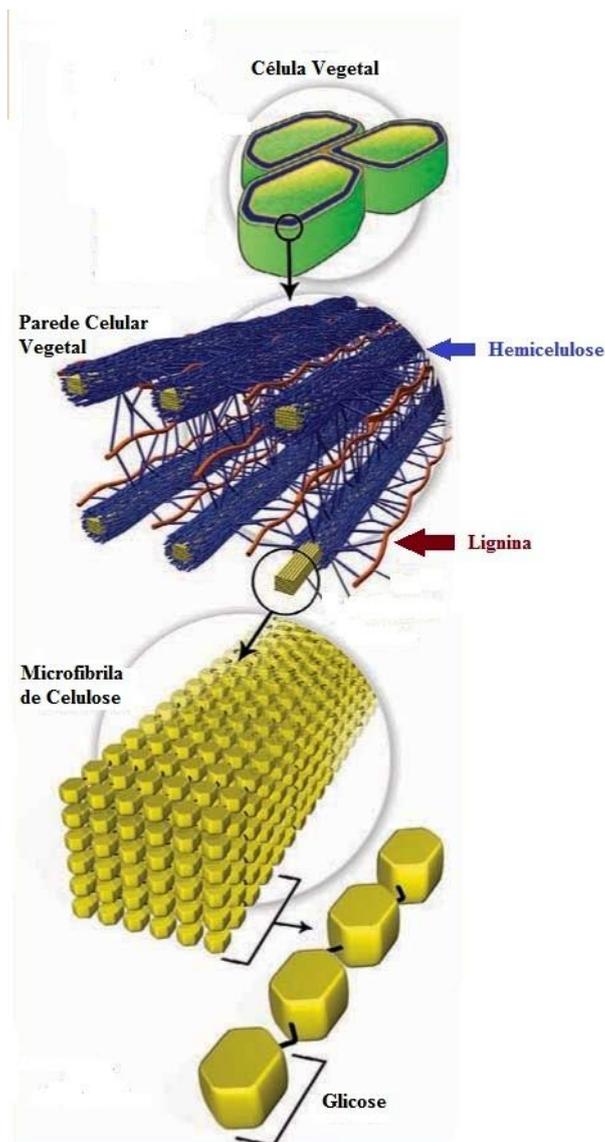
Produtos de diversos ramos industriais são obtidos pela conversão de biomassa, sendo que a utilização desses recursos tem aumentado nos últimos anos devido ao desenvolvimento de técnicas de produção industrial e de biologia molecular que possibilitaram uma diminuição nos custos de produção e um grande aumento na produtividade (Das and Singh, 2004). Em processos que utilizam biomassa vegetal como substrato para obter-se produtos comerciais, as enzimas hidrolíticas desempenham um papel central na quebra desses polímeros pela adição de moléculas de água (Buchholz and Seibel, 2008).

Atualmente, a conversão da lignocelulose em energia exige pré-tratamentos químicos para quebrar os resíduos de lignina (deslignificação) e possibilitar um maior acesso das enzimas às fibras de celulose e hemicelulose. Um dos tratamentos mais comuns é realizado com ácidos fortes a elevadas temperaturas e pressão, sendo necessário o resfriamento e a neutralização das fibras antes da adição das enzimas hidrolíticas, que devem ser resistentes a condições extremas para aumentar a velocidade e o rendimento deste processo. O alto custo na utilização da lignocelulose como fonte de energia também está relacionada com a carência de celulasas e xilanasas eficientes, produzidas a baixos custos, que atuem de maneira sinérgica e não sejam inibidas pelos seus produtos (Gallezot, 2008, Mosier *et al.*, 2005).

## 5. Estrutura e Composição da Parede Celular Vegetal

A parede celular de plantas é formada, principalmente, por uma associação de celulose, lignina e hemicelulose, denominada lignocelulose. O principal componente desta parede celular é a celulose (35-50%), a qual determina grande parte de sua estrutura e rigidez. A celulose é um homopolissacarídeo formado por monômeros de D-glicose unidos por ligações  $\beta$ -1,4. Estas moléculas estão unidas, por ligações de Hidrogênio e forças de Van der Waals, em microfibrilas que se entrelaçam formando filamentos delgados. Estas fibras estão dispostas em regiões cristalinas entremeadas por regiões amorfas. O arcabouço de celulose é preenchido por lignina que constitui cerca de 20-40% da parede celular vegetal e por uma matriz de moléculas não celulósicas entrelaçadas denominadas hemiceluloses que constitui de 20-30% da parede celular vegetal (Lagaert *et al.*, 2009). Em razão das suas propriedades bioquímicas, as hemiceluloses mantêm interações covalentes com as moléculas de lignina e não-covalentes com as moléculas de celulose. A associação covalente de hemiceluloses com lignina forma uma camada sobre as fibras de celulose protegendo estas contra a degradação por celulasas (Figura 1).

O principal constituinte da hemicelulose é a xilana (Figura 2), sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. A molécula de xilana é um heteropolissacarídeo cuja cadeia principal é formada de resíduos de D-xilanopirranose unidos por ligações  $\beta$ -1,4 podendo conter ramificações (Collins *et al.*, 2005). As ramificações consistem de O-acetil,  $\alpha$ -L-arabinofuranosil,  $\alpha$ 1,2-glucurônico e ácido O-metilglucurônico (Aspinall, 1959). A combinação de celulose com xilana é a maior fonte de biomassa da Terra e poderá suprir a demanda global de matéria prima para a produção de energia (Hames, 2009).



**Figura 1:** Diagrama esquemático da parede celular presente em células vegetais (figura extraída de <http://ucce.ucdavis.edu/files/repository/calag/fig6304p186.jpg>, com adaptações).

## 6. Enzimas Celulolíticas

A família das hidrolases glicosídicas possui um grupo de enzimas que hidrolisam especificamente as ligações  $\beta$ -1,4 de oligossacarídeos e polissacarídeos, denominadas celulasas. Segundo o modelo mais tradicional para o sistema de hidrólise de celulose por microrganismos, originalmente descrito para os fungos *Phanerochaete*

## INTRODUÇÃO

---

*chryso sporium* (Covert *et al.*, 1993) e *Trichoderma koningii* (Beguin and Aubert, 1994, Reese *et al.*, 1950, Wood and McCrae, 1978), a ação cossinérgica de três atividades específicas é necessária. As endoglicanases (EG,  $\beta$ -1,4-D-glicanohidrolases, EC 3.2.1.4) clivam aleatoriamente as ligações  $\beta$ -1,4 ao longo das cadeias de celulose, preferencialmente nas regiões menos cristalinas, ou amorfas, das microfibrilas, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e conseqüentemente novas extremidades. As exoglicanases ou celobiohidrolases (CBH,  $\beta$ -1,4-glicanocelobiohidrolase, EC 3.2.1.91) removem resíduos de celobiose das extremidades reductoras ou não reductoras geradas pela ação das endoglicanases e possuem alta afinidade para a celulose insolúvel, como a celulose ultracristalina. As  $\beta$ -glicosidases ou celobiasas ( $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolases, EC 3.2.1.21) clivam resíduos de celodextrinas e celobiose gerados pela ação das endoglicanases e celobiohidrolases, liberando moléculas de glicose (Jeoh *et al.*, 2006, Lynd *et al.*, 2002).

Para bactérias, diversos modelos são descritos (Rabinovich *et al.*, 2002, Stricker *et al.*, 2008, Xu Q. *et al.*, 2003), tais como os celulosomos, complexos multienzimáticos, de grande massa molecular que podem apresentar uma atividade para degradar celulose cristalina alta e incomum, indicando que possuem domínios de ligação à celulose (Gilbert, 2007). Quando foi descrito pela primeira vez, em um bacilo termofílico Gram positivo *Clostridium thermocellum* (Lamed *et al.*, 1983), o celulosomo foi apresentado como um complexo que possui hidrolases glicosídicas, carboidrato esterases e polissacarídeo liases aderidas a parede celular da bactéria por domínios conservados de adesinas e coesinas (Beguin and Lemaire, 1996). Recentemente, diversas outras organizações foram descritas para celulosomos de outros organismos, inclusive do gênero *Clostridium* (Schaeffer *et al.*, 2002, Xu Q. *et al.*, 2003).

## INTRODUÇÃO

---

Para o gênero *Bacillus*, alguns celulosomos são descritos, como em *B. megaterium* (Beukes and Pletschke, 2006) e em *B. polymyxa* (Gorska *et al.*, 2001), mas este não é o modelo celulolítico frequentemente encontrado no gênero. A maior parte das celulasas descritas em espécies do gênero *Bacillus* é de ação livre (Yang D. *et al.*, 2010), sendo secretadas para o meio, com atividade específica para um substrato e dependentes da ação sinérgica de diferentes atividades celulolíticas, como endoglicanase, exoglicanase e  $\beta$ -glicosidase (Afzal *et al.*, 2010, Choi *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2009). Há também algumas linhagens de *Bacillus* que apresentam celulasas com multidomínios catalíticos e de ligação ao substrato (Han *et al.*, 1995, Kim C. H., 1995), e há linhagens em que as celulasas podem ficar aderidas a parede celular (Boraston *et al.*, 2003, Borriss *et al.*, 1980).

De maneira geral, as celulasas de ação livre presentes nas espécies do gênero *Bacillus* são alvos em potencial para a clonagem e expressão heteróloga em organismos fermentadores, diminuindo o custo de sua produção e aumentando a viabilidade para a utilização industrial (Blumer-Schuetz *et al.*, 2008).

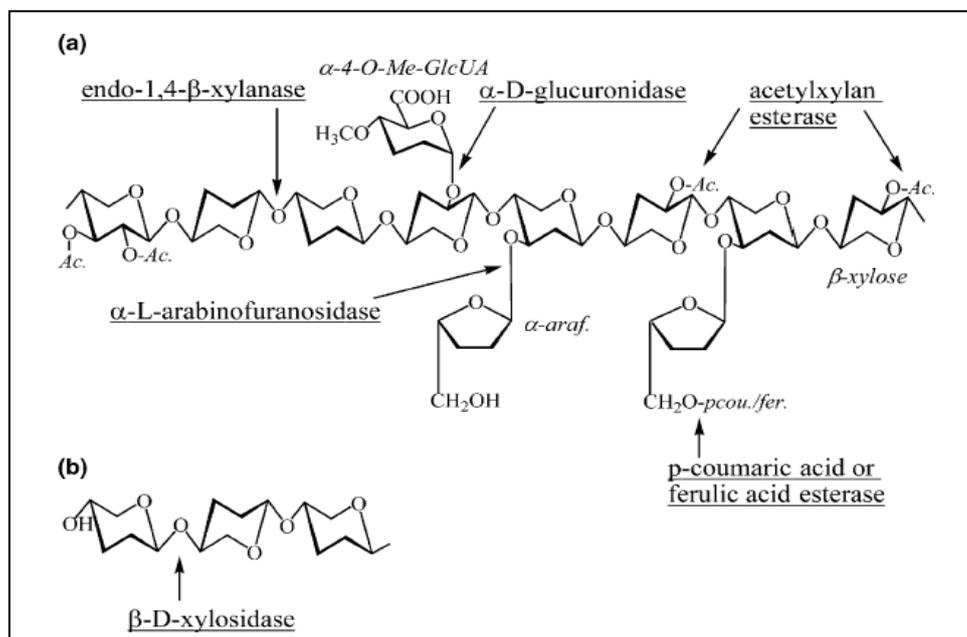
## 7. Enzimas Xilanolíticas

Em razão da sua heterogeneidade e complexidade a molécula de xilana requer diferentes enzimas para degradação completa de sua cadeia principal e ramificações. A figura 2 ilustra a estrutura da xilana e os sítios de ação das diferentes enzimas xilanolíticas. A Endo-1,4- $\beta$  xilanase (E.C.3.2.1.8) hidrolisa a cadeia principal da molécula de xilana sendo que os sítios de clivagem dependem do substrato, tamanho da cadeia, grau e tipos de ramificação (revisado por Polizeli *et al.*, 2005). A 1,4- $\beta$ -D-xilosidase (E.C.3.2.1.37) faz a clivagem de pequenos xilooligossacarídeos e xilobiose

## INTRODUÇÃO

liberando xilose (Figura 2b). As ramificações das moléculas de xilana são clivadas pelas exo-enzimas:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (E.C.3.2.1.55),  $\alpha$ -D-glucuronidase (E.C.3.2.1.139), acetil xilana esterase (E.C.3.1.1.72), ácido ferúlico esterase (E.C.3.1.1.73) e ácido p-coumárico esterase (E.C.3.1.1.) e liberam, respectivamente, arabinofuranose, ácido glucorônico, grupo acetil e ácidos fenólicos.

Sistemas xilanolíticos contendo todas essas atividades enzimáticas são descritos em uma variedade de organismos dentre eles fungos filamentosos (Belancic *et al.*, 1995, Terrasan *et al.*, 2010) e bactérias (Aizawa *et al.*, 2010, Bao *et al.*, 2009, Sunna *et al.*, 1997). Atividades xilanolíticas são ainda detectáveis em diversos organismos como fungos marinhos (Raghukumar *et al.*, 2004), protozoários, crustáceos, insetos, sementes de plantas e até mesmo em farinha de trigo (Cleemput *et al.*, 1997).



**Figura 2.** Estrutura de uma molécula de xilana. Em (a), os sítios de ação das diversas enzimas hidrolíticas. Em (b) a hidrólise de xilooligossacarídeos por uma  $\beta$ -D-xilosidase (Collins *et al.*, 2005).

## INTRODUÇÃO

---

No gênero *Bacillus*, são descritas diversas xilanases extracelulares com ação livre e multidomínios catalíticos (Armstrong *et al.*, 2010, Rasmussen and Meyer, 2010, Reitinger *et al.*, 2010, Yoon, 2009), sendo o modelo mais comum ao gênero. Particularmente interessantes para a indústria do papel, têm sido as xilanases alcalinofílicas isoladas de *B. pumilus* (Bao *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2009), fundamentais aos processos de branqueamento.

### **8. Aplicações Biotecnológicas de Celulases e Xilanases**

Sendo a matéria orgânica mais abundante do mundo, a celulose tem papel central nos ciclos biogeoquímicos naturais, mas também é de grande importância para diversas atividades humanas, como indústrias de madeira, papel, alimentos e roupas (Figura 3).

Em todos esses processos é possível o uso de celulases, embora este ainda seja um recurso subutilizado devido ao alto custo de produção das enzimas. Tendo em vista a grande quantidade de matéria vegetal que é produzida como rejeito agrícola e industrial, também há um grande potencial para o uso de celulases nos processos de reciclagem (Bayer *et al.*, 2007).



## INTRODUÇÃO

---

biomassa lignocelulósica, abundante e de baixo custo, sendo encontrada em resíduos agrícolas e descartes industriais em forma de talo de milho, palha de cereais, bagaço de cana-de-açúcar e resíduos na indústria alimentícia e de produção de papel. Tem sido estimado que resíduos lignocelulósicos constituam cerca de 50% da biomassa mundial (Harris and Debolt, 2010). Entretanto, a utilização de lignocelulose como substrato para produção de etanol apresenta uma barreira em relação a sua complexa estrutura sendo necessárias diversas enzimas para sua completa degradação. Nos processos atualmente utilizados, a degradação de lignocelulose é realizada em duas etapas: pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos para liberação de celulose e hemicelulose e subsequente tratamento enzimático que gera glicose a partir de celulose e xilose a partir de hemicelulose (Gnansounou, 2010, Luo *et al.*, 2010).

O Brasil, como segundo maior produtor mundial de bioetanol, utiliza como fonte primária para a fermentação alcoólica o caldo da cana-de-açúcar, e tem a maior parte do bagaço utilizado para a produção de energia elétrica pela sua combustão nas caldeiras das usinas de fermentação e como suplemento de rações para animais ruminantes. Há um excedente de aproximadamente 10% do bagaço de cana, que geralmente é incinerado ou depositado em aterros sanitários. Processos de combustão mais eficientes poderiam ser adotados para a queima do bagaço da cana, aumentando o rendimento na produção de energia elétrica e, conseqüentemente, a quantidade de excedentes (Santos, 2009).

Uma das perspectivas para a utilização de rejeitos agrícolas, como o bagaço da cana, é a deslignificação destes substratos – o bagaço de cana é composto em média por aproximadamente 15% a 24% de lignina, 22% a 30% de hemicelulose e de 30% a 55% de celulose (Silva, 2007) – por processos de hidrólise ácida e a subsequente sacarificação dos substratos restantes com enzimas celulolíticas e xilanolíticas (Kumar *et al.*, 2008). A produção de bioetanol a partir dos produtos desses processos pode

## INTRODUÇÃO

---

dobrar a produção nacional deste biocombustível sem aumento da área plantada (Santos, 2009). O atual desperdício de substratos lignocelulósicos está associado ao alto custo da produção de enzimas que realizem a sacarificação deste substrato com eficiência (Lynd *et al.*, 2008).

Nesse contexto, uma procura por novas celulases e xilanases que possuam uma alta atividade para substratos complexos, como lignocelulose, que possam ser produzidas a baixo custo e que não sejam inibidas pelo produto vem se desenvolvendo por toda a comunidade científica, não só para a produção de biocombustíveis, mas também para aumentar a produtividade de outras indústrias, como papéis e roupas, e para viabilizar a reciclagem dos rejeitos agroindustriais lignocelulósicos.

O grupo de Biotecnologia Molecular da Universidade de Brasília coletou água de fontes termais de Caldas Novas visando o estudo da microbiota local e a caracterização de enzimas de interesse comercial.

*Objetivos*

## OBJETIVOS

---

### **Geral:**

Isolar, identificar e caracterizar, quanto ao perfil enzimático, uma bactéria da água de fontes termais do cerrado de Goiás.

### **Específicos:**

- Isolar em meio de cultura colônias de bactérias presentes em água de fontes termais de Caldas Novas - GO.
- Analisar as bactérias morfológicamente e pelo método diferencial de Gram
- Realizar uma varredura quanto à faixa de temperatura de crescimento e a atividade celulolítica e xilanolítica, selecionando a bactéria com maior temperatura de crescimento e maior atividade enzimática.
- Identificar a bactéria selecionada com a utilização de ferramentas filogenéticas moleculares (sequências genômicas da subunidade ribossomal 16S e da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase).
- Descrever a bactéria selecionada quanto ao crescimento, consumo de substrato e secreção em condições de crescimento controlado (biorreator) em diferentes fontes de carbono.
- Caracterizar as celulasas e xilanases presentes no sobrenadante das culturas desta bactéria quanto à atividade enzimática, temperatura ótima, pH ótimo e termoestabilidade.

*Material*

*e*

*Métodos*

# MATERIAIS

---

## 1. Considerações Gerais

Todas as soluções e meios de cultura foram preparados com água destilada ou mille-Q. Quando necessário esterilização, foram submetidos à autoclave a 121 °C por 20 minutos. O material plástico e as vidrarias estéreis foram submetidas ao mesmo processo de esterilização por 40 minutos. As soluções sensíveis ao calor foram esterilizadas por filtração usando-se membranas tipo Millipore com poro de 0,22 µm.

Os protocolos utilizados, em sua maioria, seguem as técnicas descritas no manual laboratorial *Molecular Cloning* (Sambrook and Russell, 2001).

## 2. Marcadores de tamanho para DNA

Foram utilizados os marcadores de tamanho para DNA *1 kb ladder* e *100 pb ladder* da LGCBIO™.

## 3. Marcador de massa molecular de proteínas.

Foi utilizado o marcador de massa molecular de proteínas *Unstaind Protein Marker* da Fermentas™, fervido por 5 minutos antes da utilização.

## 4. Oligonucleotídeos sintéticos

Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores em reações de polimerização em cadeia estão descritos na Tabela 1, com as respectivas sequências e temperaturas de anelamento (T<sub>m</sub>). Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir das sequências dos

## MATERIAIS

genes da subunidade 16S do RNA ribossomal de diversos filios do domínio *Bacteria* (Wilson *et al.*, 1990) e dos genes da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase de *B. subtilis* (Qi *et al.*, 2001).

**Tabela 1.** Característica dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados nas reações de polimerização em cadeia.

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>T<sub>m</sub></b>
R16Sa	5' GTGCTGCAGAGAGAGTTTGATCATGGCTCAG 3'	68,7°C
R16Sb	5' CACGGATCCAAGGAGGTGATCCANCCNCACC 3'	72,3°C
RPOb1	5'-CGTGTTATCGTTTCCCAGC-3'	53,9°C
RPOb2	5'-AAGATGATCGATATCATCTG-3'	46,4°C

(Qi *et al.*, 2001, Wilson *et al.*, 1990)

## 5. Meios de Cultura

### 5.1. Meio Lúria – Bertani (LB), pH 7,0

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Peptona de caseína	1,0% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)

Para o meio sólido foram adicionados 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico.

## MATERIAIS

---

### 5.2. Meio mínimo M9 ágar, pH 7,0

Solução de sais M9 5X	200 mL
Fonte de Carbono	0,5% (p/v)
Ágar bacteriológico	1,5% (p/v)
H <sub>2</sub> O q. s. p.	1000 mL

### 5.3. Meio M9S pH, 7,0

Solução de sais M9 5X	200 mL
Fonte de Carbono	0,5% (p/v)
Extrato de levedura	de 0% a 0,2% (p/v)
Caso Aminoácidos	0,1% (p/v)
H <sub>2</sub> O q. s. p.	1000 mL

As fontes de carbono utilizados foram Glicose, Carboximetilcelulose de baixa viscosidade (CMC, número de catálogo C5678), Celulose Ultracristalina (UCel, número de catálogo S3504), Xilana *oat spelts* (XOS, número de catálogo X0627) e Xilana *Birchwood* (XBW, número de catálogo X0502), todos fornecidos pela SIGMA.

# MATERIAIS

---

## 5.4. Solução de Sais M9 5X

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6,4% (p/v)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5% (p/v)
NaCl	0,25% (p/v)
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,50% (p/v)

## 5.5. Meio Ágar-Sangue, pH 6,8

Meio Base para ágar sangue da Merck	4% (p/v)
Sangue humano recém coletado desfibrinado	5% (v/v)

## 6. Soluções

### 6.1. Solução de glicerol 50%

Glicerol	50% (p/v)
----------	-----------

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 6.2. Solução de Fucsina

Fucsina	1,0% (p/v)
---------	------------

## MATERIAIS

---

### 6.3. Solução de Cristal Violeta

Cristal Violeta	1,0% (p/v)
Etanol anidro	20% (v/v)
Oxalato de amônio	0,8% (p/v)

A solução ficou reservada a temperatura ambiente por 24h e foi filtrada em filtro de papel antes da utilização.

### 6.4. Solução de Lugol

Iodo metálico	1% (p/v)
Iodeto de Potássio	2% (p/v)

### 6.5. Solução de vermelho Congo

Vermelho Congo	0,1% (p/v)
----------------	------------

### 6.6. Solução de HCl 1M

HCl P.A.	3,0% (p/v)
----------	------------

### 6.7. Solução de NaOH 1M

NaOH	4,0% (p/v)
------	------------

## MATERIAIS

---

### 6.8. Solução de brometo de etídeo

Brometo de Etídeo	1,0% (p/v)
-------------------	------------

### 6.9. Tampão de corrida para eletroforese em gel de agarose TEB 10X, pH 8,2

Trizma base	0,89 M
-------------	--------

Ácido Bórico	0,89 M
--------------	--------

EDTA	0,08 M
------	--------

### 6.10. Tampão de amostra 6X para eletroforese em gel de agarose

TEB 20X	50% (v/v)
---------	-----------

Glicerol	30% (v/v)
----------	-----------

Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)
--------------------	-------------

Xilenocianol	0,25% (p/v)
--------------	-------------

### 6.11. Tampão da Taq DNA Polimerase Platinum® de alta fidelidade 10X (Invitrogen)

Tris-SO <sub>4</sub> pH 8,9	600 mM
-----------------------------	--------

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	180 mM
---	--------

## MATERIAIS

---

### 6.12. Solução de Comassie Blue 10X

Metanol	40,00% (v/v)
Ácido acético	10,00% (v/v)
Comassie Brilhante Blue R	0,25% (p/v)

### 6.13. Solução de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 50X

PMSF	50 mM
------	-------

### 6.14. Reagente de Bradford

Azul de Comassie Brilhante G	0,01% (p/v)
Etanol	4,70% (v/v)
Ácido orto-fosfórico	8,50% (v/v)

Filtrado em filtro de papel.

### 6.15. Tampões para ensaios enzimáticos 4X

Citrato de sódio	400 mM	pH 3 ou 4
Acetato de sódio	400 mM	pH 5 ou 6
Fosfato de sódio	400 mM	pH 7
Tris-HCl	400 mM	pH 8 ou 9

## MATERIAIS

---

### 6.16. Soluções de substratos para ensaios enzimáticos 4X

Carboximetilcelulose (CMC)	4% (p/v)
Celulose ultracristalina (UCel)	4% (p/v)
Xilana <i>birchwood</i> (XBW)	4% (p/v)
Xilana <i>oat spelts</i> (XOS)	4% (p/v)

A XOS e UCel foram aquecidas no forno microondas por 1 minuto, agitadas manualmente, deixadas em repouso por 1 minuto e homogeneizadas por forte agitação antes da utilização.

### 6.17. Solução de DNS

Ácido Dinitrosalicílico (DNS)	10,0 g
NaOH 2M	200 mL
Tartarato de Sódio e Potássio	300 g

O DNS foi dissolvido sob aquecimento na solução de NaOH sendo acrescentado o tartarato de sódio e potássio previamente dissolvidos em 500 mL de água destilada aquecida. A solução foi deixada sob agitação e aquecimento até ser observada a completa dissolução dos reagentes quando o volume de água destilada foi completado para 1000 mL.

## MATERIAIS

---

### 6.18. Acrilamida:bis-acrilamida (28:2)

Acrilamida	28 g
Bis-acrilamida	2 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada ao abrigo da luz a 4°C.

### 6.19. Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

Tris base	18,2 g
Água destilada q. s. p.	100 mL

O pH foi ajustado com HCl fumegante.

### 6.20. Tris-HCl 1 M, pH 6,8

Tris base	12,1 g
Água destilada q. s. p.	100 mL

O pH foi ajustado com HCl fumegante.

### 6.21. SDS 10% (p/v)

SDS	10 g
-----	------

## MATERIAIS

---

### 6.22. Persulfato de amônia (APS) 10% (p/v)

APS 1 g

O APS foi dissolvido em água no momento do uso.

### 6.23. Ácido tricloroacético (TCA) 100% (p/v)

Um volume de 1 mL de água destilada foi adicionado a 50 g de ácido tricloroacético. Após todo o ácido ser dissolvido, adicionou-se água destilada suficiente para um volume final de 50 mL e a solução obtida foi estocada a 4°C.

### 6.24. Tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante 2X

Tris-HCl 1 M pH 6,8	20% (v/v)
SDS	4% (p/v)
$\beta$ -Mercaptoetanol	4% (v/v)
Glicerol	20% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)



## MÉTODOS

---

### **7. Coleta e isolamento das bactérias.**

A coleta foi realizada no dia 7 de Janeiro de 2008 às 10h da manhã no horário oficial de Brasília. Duas fontes termais localizadas no parque nacional de Caldas Novas, GO (17° 45' 12" S, 48° 38' 27" O), tiveram 5 mL de suas águas coletados individualmente em tubos de rosca estéreis. A coleta foi realizada a 10 cm da superfície de cada fonte, e no mesmo ponto a temperatura foi mensurada com termômetro de mercúrio da Incoterm, modelo laboratorial e o pH medido com fitas indicadoras de pH da MERCK. As amostras coletadas foram armazenadas no gelo por 5h até serem divididas em 5 alíquotas de 1 mL cada. Para a amostra de cada fonte termal, quatro alíquotas foram filtradas individualmente em uma membrana tipo Millipore de 0,22 µm, a quinta alíquota de cada poço foi armazenada com glicerol 25% a -80,0 °C. Em seguida, cada membrana foi transferida para uma placa de Petri contendo 20 mL de meio LB ágar e incubadas à temperatura de 42 °C. Após 24 h de incubação, as colônias formadas foram re-isoladas em meio LB ágar fresco e incubadas por mais 18 h a 42 °C. Em seguida, a morfologia das colônias foi avaliada e, dentre aquelas que apresentavam morfologia semelhante, apenas uma colônia foi selecionada e transferida para meio LB ágar fresco, incubada por 18 h a 42 °C e, em seguida, estocadas a 4 °C por dois dias. As colônias não selecionadas foram cultivadas em 5 mL de meio LB por 12 h a 42 °C, tendo uma alíquota de 500 µL armazenada com glicerol 25% a -80,0 °C.

### **8. Coloração de Gram (Vos, 2009 com adaptações)**

As bactérias foram cultivadas em meio LB ágar por 12 h a 42 °C. Uma pequena amostra de cada colônia foi fixada em uma lâmina de microscopia ótica e tratada com os seguintes reagentes: solução de Cristal Violeta por 1 minuto, solução de Lugol por 1 minuto, Etanol 100% por 15 segundos, solução de Fuccina por 1 minuto e em seguida

## MÉTODOS

---

foram levadas com água destilada para a observação em um microscópio ótico acoplado com uma câmera fotográfica em um aumento de 840X. A captura da imagem, e o estabelecimento da escala foi realizada pelo programa AxioVision 5.1, distribuído pela MIU.

### **9. Seleção de atividade enzimática em placa de Petri (Sambrook and Russell, 2001)**

As bactérias foram cultivadas em placas contendo meio mínimo M9 com ágar 1,5% e acrescido de uma fonte única de carbono. Foram utilizados carboximetilcelulose (CMC), celulose ultracristalina (UCel) e xilana *oat spelts* (XOS) como fontes de carbono, todos na concentração de 0,5% (p/v). Inicialmente as placas foram incubadas a 42 °C por 24 h e em seguida foram incubadas a 55 °C por mais 24h. A atividade enzimática foi detectada por coloração das placas com solução de vermelho Congo, por 15 minutos, seguida de descoloração com solução de NaCl 1 M, por 24 horas e tratamento com ácido clorídrico 1 M, por 5 minutos, para aumentar o contraste. Foi utilizado como controle positivo nesse experimento a bactéria *Bacillus liqueniformis* linhagem B-41361, uma bactéria termofílica moderada que possui atividade contra CMC e Xilana, mas não tem atividade contra UCel (Bischoff *et al.*, 2006).

### **10. Seleção quanto à temperatura de crescimento (Vos, 2009)**

Foi realizado um pré-inóculo dos 13 isolados em 5 mL de meio LB, incubados a 42 °C por 12h a 200 rpm. Em seguida, a absorbância a 600 nm do pré-inóculo foi medida para cada bactéria, e uma quantidade proporcional a absorbância foi inoculada em 100 mL de meio LB para uma OD<sub>600nm</sub> (correspondente à absorbância) inicial de 0,05. O sistema foi incubado a 40 °C, pH 7,0 sob agitação de 200 rpm. Alíquotas de 1

## MÉTODOS

---

mL foram retiradas nos seguintes tempos: 0 h (logo após o inóculo), 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 18 h e 24 h, e a sua absorbância a 600 nm medida a cada coleta.

O mesmo experimento foi realizado mais duas vezes alterando-se apenas a temperatura de incubação para 48 °C ou para 60 °C. Em seguida, um experimento nas mesmas condições foi realizado utilizando-se apenas a linhagem FT9 e alterando-se a temperatura de incubação para 80 °C. Neste último, 100 µL das alíquotas retiradas em cada tempo foram plaqueados, em meio LB ágar e incubados a 42 °C, para verificar a quantidade de células viáveis presente na cultura. As placas foram feitas em triplicata e o valor da média foi considerado para as análises.

O coeficiente angular de crescimento específico foi calculado como o coeficiente angular da regressão linear da fase exponencial de cada uma das curvas de crescimento.

### **11. Coloração para visualização de endósporos.**

A bactéria FT9 foi cultivada em meio LB ágar por 72h a 48 °C, sendo mantida em seguida por sete dias a 4 °C. Uma amostra da colônia foi fixada em uma lâmina de microscopia ótica e tratada com os seguintes reagentes: solução de Cristal Violeta por 1 minuto, solução de Lugol por 1 minuto, Etanol 100% por 15 segundos e em seguida foram lavadas com água destilada para a observação em um microscópio ótico acoplado com uma câmera fotográfica em um aumento de 1000X.

### **12. Extração do DNA genômico da bactéria FT9**

A extração do DNA genômico da bactéria FT9 foi realizada com o kit de extração de DNA “*Wizard Genomic DNA Purification Kit*” da PROMEGA™, de

## MÉTODOS

---

acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi ressuspensão em água mille-Q.

### **13. Análise de ácidos nucleicos em gel de agarose (Sambrook and Russell, 2001)**

A eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) foi realizada com TEB 1X, sendo utilizada para análise e avaliação do tamanho e integridade do DNA ou dos fragmentos de DNA. O gel foi corado com solução de brometo de etídeo antes da corrida. Todas as corridas foram realizadas com a voltagem fixa de 4 mV/cm, e após aproximadamente 2 horas, o gel foi visualizado em um transluminador de luz UV.

### **14. Reações de polimerização em cadeia (PCR)**

Todas as reações de PCR foram realizadas em um termociclador modelo PCR Express, da Thermo Hybaid, com uma vedação de borracha que impede a evaporação da água dos sistemas.

#### **14.1. Locus gênico do RNA ribossomal 16S (Wilson et al. 1990)**

Com o propósito de identificar a bactérias FT9, a região genômica que codifica o RNA ribossomal da subunidade 16S foi amplificada por PCR. Foi utilizado como DNA molde 20 ng do DNA genômico extraído e purificado da estirpe FT9. A este molde adicionou-se tampão de reação da Taq DNA Polimerase Platinum® de alta fidelidade à concentração final de 1X, 0,5 µM dos iniciadores R16Sa e R16Sb (Tabela 1), 0,2 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e uma unidade da Taq DNA Polimerase Platinum® de alta fidelidade, em um volume final de 20 µL. Os sistemas de reação foram

## MÉTODOS

---

desnaturados por 3 minutos a 96 °C e amplificados por 30 ciclos de PCR constituídos de desnaturação a 94 °C por 0,5 minuto, anelamento a 50 °C por 0,5 minuto, extensão a 72 °C por um minuto. Seguiu-se, então, uma extensão final a 72 °C por 3 minutos. Um décimo do volume foi analisado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, com o auxílio do marcador de tamanho de DNA 1 kb *ladder* da LGCBIO.

### **14.2. Locus gênico da subunidade $\beta$ da RNA polimerase (Qi et al. 2001)**

A região genômica que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase foi amplificada por PCR, utilizando como DNA molde 40 ng do DNA genômico extraído da bactéria FT9. A este molde adicionou-se tampão de reação da Taq DNA Polimerase Platinum® de alta fidelidade à concentração final de 1X, 1,0  $\mu$ M dos iniciadores RPOb1 e RPOb2 (Tabela 1), 0,2  $\mu$ M de cada dNTP, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e duas unidades enzimáticas da Taq DNA Polimerase Platinum® de alta fidelidade em um volume final de 20  $\mu$ L. Os sistemas de reação foram desnaturados por 5 minutos a 94 °C e amplificados por 30 ciclos de PCR constituídos de desnaturação a 94 °C, por um minuto, anelamento a 45 °C, por um minuto, extensão a 72 °C, por um minuto. Seguiu-se então uma extensão final a 72 °C, por 7 minutos. Um décimo do volume foi analisado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, com o auxílio de marcador de tamanho de DNA 100 pb *ladder* da LGCBIO.

### **15. Purificação dos produtos de PCR**

Os fragmentos obtidos nas reações de polimerase em cadeia foram purificados empregando-se o *QIAquick PCR Purification kit* (QUIAGEN), seguindo-se as recomendações do fabricante.

## MÉTODOS

---

### 16. Sequenciamento dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos foram seqüenciados no aparelho MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), utilizando-se o i MegaBACE *Dye Terminator*. A quantidade de amostra submetida ao sequenciamento automático foi de 150 ng de DNA, utilizando-se os mesmo iniciadores da reação de PCR à concentração final de 5 µM cada, em um volume final de 5 µL. A análise da qualidade do sequenciamento foi realizada pelos programas Phrad e Phred (<http://helix.biomol.unb.br/phph>).

### 17. Análise das seqüências de DNA

As seqüências obtidas foram sobrepostas, analisadas e a seqüência mais provável gerada pelo programa *CAP3 Assembly Program* distribuído pela *Michigan Tech* (Huang and Madan, 1999).

#### 17.1. Seqüência do *locus* gênico do RNA ribossomal 16S

A seqüência do *locus* gênico que codifica a subunidade do RNA ribossomal 16S da bactéria FT9 foi comparada com o banco de dados do *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2005, Cole *et al.*, 2007, Cole *et al.*, 2009) e as seqüências de *B. thuringiensis* (linhagens IMER-B3-1 e IMER B5-15), *B. cereus* (linhagens MEX244.1 e DAN19), *B. anthracis* (linhagem Sterne), *B. mycoides* (linhagem ATCC6462), *Bacillus sp.* (linhagens 240B1, SBK-6), *B. magaterium* (linhagem C1), *B. pumilus* (linhagem EI-24-10), *B. subtilis subtilis* (linhagem IAM 12118T), *B. amyloliquefaciens* (linhagem ATCC 23350), *B. mojavensis* (linhagem M-1), *B. licheniformis* (linhagem YW1257), *Lactobacillus sp.* (seqüência genérica), *B. circulans* (WSBC20059), *Geobacillus*

## MÉTODOS

---

*thermocatenulatus* (linhagem DSM 730) e *Thermobacillus xylanilyticus* (linhagem XE) foram selecionadas para a construção de uma árvore filogenética baseada no método de máxima parcimônia, com o teste estatístico de *bootstrap* 1000 vezes.

### 17.2. Sequência do *locus* gênico da subunidade $\beta$ da RNA polimerase

A sequência do *locus* gênico que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase da bactéria FT9 foi alinhada com mais nove sequências do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), quatro linhagens de *B. anthracis* (linhagens A74, AC1, Sterne e Vollum, com números de acesso AF205329, AF205331, AF205323 e AF205319, respectivamente), duas linhagens de *B. cereus* (linhagens Bc 23261 e Bc 27877, com números de acesso AF205338 e AF205342, respectivamente), duas linhagens de *B. thuringiensis* (linhagens Bt 8 e Bt 35646, com números de acesso AF205349 e AF205348, respectivamente) e uma linhagem de *B. subtilis* ATCC 6051 (número de acesso AF205356), utilizando o algoritmo *Clustal W* com um teste estatístico de *bootstrap* 1000 vezes do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999).

Para a construção da árvore filogenética foram adicionadas a esse alinhamento as sequências de *B. cereus* (linhagem B4264 com número de acesso CP001176), *B. thuringiensis* (linhagens Bt 10 e Bt T07-202 com número de acesso AF205347 e AF205346, respectivamente), *B. amyloliquefaciens* (linhagem FZB42 com número de acesso CP000560), *B. halodurans* (linhagem C-125 com número de acesso BA000004), *B. mycoides* (linhagem ATCC 6462 com número de acesso AF205343), *B. pseudofirmus* (linhagem OF4 com número de acesso CP001878), *B. pumilus* (linhagem SAFR-032 com número de acesso CP000813), *B. simplex* (linhagem I5b8s com número

## MÉTODOS

---

de acesso EU305870), *B. subtilis* (linhagem 6051 com número de acesso AF205356) e *Staphylococcus epidermidis* (linhagem SR1 com número de acesso AF269441), foi utilizado o programa MEGA versão 4 (Tamura K. *et al.*, 2007) com os métodos de máxima parcimônia, evolução mínima e *NeighborJoin*, com o teste estatístico de *bootstrap* 1000 vezes.

### **18. Hemólise em meio ágar-sangue (Murray and Baron 2007a)**

Para o preparo do meio ágar sangue, 10 mL de sangue humano foram coletados de um doador voluntário, submetidos à leve agitação com pérolas de vidro durante 5 minutos e reservado em ambiente estéril. Foram preparados 47,5 mL do meio base para ágar sangue de acordo com as instruções do fabricante (MERCK), que após autoclavado e resfriado à temperatura de aproximadamente 50 °C, teve 2,5 mL de sangue desfibrinado adicionados e homogeneizados por agitação leve. Em seguida, o meio foi vertido em duas placas de Petri, 25 mL em cada. Após a solidificação do meio, a bactéria FT9 foi inoculada e as placas foram incubadas a 42 °C, por 48 h.

### **19. Determinação da concentração ótima de fonte de nitrogênio**

Quatro culturas independentes do *Bacillus sp.* FT9 foram realizadas em frascos de 300 mL em meio M9S com CMC 0,5% (p/v), à temperatura de 48 °C, pH inicial igual a 7,0, sob agitação de 300 rpm e volume final de 100 mL. Os pré-inóculos foram realizados em 5 mL de meio LB e incubados por 12 horas a 48 °C. Cada cultura possuía uma concentração de fonte de nitrogênio (Extrato de Levedura) diferente, 0,0 g/L, 0,5 g/L, 1,0 g/L e 2,0 g/L. Após 6 h e após 12 h de cultivo, amostras de 1 mL das culturas

## MÉTODOS

---

foram retiradas e centrifugadas por 5 minutos a 3000 x g. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore de 0,22 µm, e submetido a um ensaio enzimático contra CMC pelo método do DNS e à dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

### **20. Cultivo do *Bacillus sp.* FT9 em diferentes fontes de carbono**

Todas as fermentações da bactéria *Bacillus sp.* FT9 foram realizadas em biorreator BioFlo 110, da New Brunswick Scientific, com volume máximo de 2000 mL, esterilizado por calor úmido (121 °C por uma hora) e as partes sensíveis a calor desinfetadas com etanol 70%. Foi utilizado o meio M9S (com extrato de levedura 0,1%) com temperatura constante a 48 °C, pH constante a 7,0 e agitação constante de 200 rpm, em um volume final de 1000 mL. O pH foi mantido constante com a adição automática de hidróxido de amônio 10 M ou de ácido fosfórico 10 M, de acordo com variação do pH do meio. Todos os pré-inóculos do *Bacillus sp.* FT9 foram realizados em 100 mL de meio LB incubados por 12h a 48 °C. Todas as condições descritas foram exatamente as mesmas para todas as fermentações realizadas com o *Bacillus sp.* FT9, alterando-se apenas a fonte de carbono utilizada em cada experimento. Os substratos utilizados foram glicose, carboximetilcelulose de baixa viscosidade (CMC), Celulose Ultracristalina (UCel), Xilana *oat spelts* (XOS) e Xilana *birchwood* (XBW), todos à concentração inicial de 5,0 g/L.

Uma amostra da cultura de 1 mL foi retirada a cada uma hora durante as 12 horas de fermentação, sendo que a cada 3h também foi retirada uma amostra de 10 mL da cultura. As amostras de 1 mL foram utilizadas para a contagem de células viáveis e para a dosagem de substrato no meio. E as amostras de 10 mL foram tratadas com o inibidor de protease PMSF 1 mM, centrifugadas por 5 minutos a 3000 x g e o

## MÉTODOS

---

sobrenadante filtrado em membrana Millipore de 0,22 µm. Em seguida, a amostra foi dividida em alíquotas de 1 mL e utilizada para os ensaios enzimáticos ou armazenado a -20 °C.

### **21. Contagem de células viáveis (Murray and Baron, 2007a)**

Diluições das amostras das culturas (de 1:10<sup>3</sup> a 1:10<sup>6</sup>) de *Bacillus sp.* FT9 foram plaqueadas em meio LB ágar e incubadas a 48 °C por 12h. No mínimo três placas foram feitas para cada amostra, e a média entre o número de colônias em cada uma foram utilizadas para estimar o número total de células viáveis presentes nas culturas em cada tempo.

### **22. Dosagem de substrato na cultura – Método da hidrólise ácida (Sambrook and Russell, 2001)**

Cerca de 100 µL da cultura foram incubados com 100 µL de ácido clorídrico 1 M por uma hora em água em ebulição. Em seguida, adicionou-se 100 µL de hidróxido de sódio 1 M e a quantidade de açúcar redutor presente na amostra foi estimado pelo método do DNS. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a média entre os valores foi utilizada para a comparação com a curva padrão. A curva padrão foi construída para cada substrato a partir de quantidades conhecidas destes.

## MÉTODOS

---

### **23. Dosagem de açúcar redutor – Método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Tamura Z. and Nakajima, 1967 com adaptações)**

Para a dosagem da quantidade de açúcar redutor em uma amostra, foi adicionado DNS na proporção de três volumes de DNS para um volume da amostra. Em seguida, a amostra foi incubada em água em ebulição, por 5 minutos e a absorvância medida a 540 nm em placas de 96 poços no espectro fotômetro *SpectraMax* (Molecular Devices<sup>TM</sup>).

### **24. Dosagem de Proteínas – Método de Bradford (Kruger, 1994)**

Cerca de 10  $\mu$ L de amostra foram incubados com 200  $\mu$ L do reagente de Bradford e incubados por cinco minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a absorvância foi medida a 595 nm e o valor obtido foi comparado com uma curva padrão construída a partir de quantidades conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

### **25. Cálculo da taxa de crescimento e dos rendimentos de fermentação**

A taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) foi calculada como a diferença do logaritmo natural da quantidade inicial de células e do logaritmo natural da quantidade final de células dividida pela variação do tempo. O rendimento em número de células relativo ao substrato (Y) foi calculado como a razão entre a variação do número de células viáveis e a variação da quantidade de substrato consumido durante o mesmo período. O rendimento em proteínas secretadas relativo ao substrato (P) foi calculado como a razão entre a variação da quantidade de proteínas no sobrenadante da cultura e a variação da quantidade de substrato consumido durante o mesmo intervalo de tempo. E

## MÉTODOS

---

o rendimento em proteínas secretadas relativo ao número de células (R) foi calculado como a razão entre a variação da quantidade de proteínas no sobrenadante da cultura e a variação do número de células viáveis durante o mesmo período.

### **26. Ensaio enzimáticos com os sobrenadantes das culturas (Sharrock, 1988)**

Para determinar a atividade enzimática dos sobrenadantes das culturas de *Bacillus sp.* FT9 crescidas em diferentes fontes de carbono, foram adicionados a 100 µL do sobrenadante, 50 µL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 4X e 50 µL de um dos substratos 4%. (CMC, UCel, XOS e XBW). Para a dosagem de celulases total (FTPase), foi adicionado a 100 µL do sobrenadante, 50 µL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 4X, 50 µL de água mille-Q e uma tira de papel de filtro com dimensões de 5x20 mm. O sistema foi incubado a 50 °C por 30 minutos e a quantidade de açúcar redutor medida pelo método do DNS. Os resultados foram comparados com uma curva padrão construída com valores conhecidos de glicose (para os ensaios contra CMC, UCel e Papel de filtro) e de xilose (para os ensaios contra XOS e XBW). A atividade enzimática foi expressa em Unidade Internacional (UI), cuja uma unidade é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um µmol de açúcar redutor por minuto.

### **27. Efeito do pH sobre a atividade das enzimas**

O efeito do pH sobre a atividade das enzimas presentes no sobrenadante das culturas de *Bacillus sp.* FT9 foi determinado realizando ensaios enzimáticos como

## MÉTODOS

---

descrito no item 26, a 50 °C e com tampões atuando para pH diferentes. Os valores de pH variaram de 3,0 a 9,0 e os respectivos tampões utilizados em cada ensaio estão dispostos no item 6.15. Apenas o sobrenadante que apresentou a maior atividade contra um substrato foi utilizado no ensaio contra aquele substrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e o valor médio foi utilizado para plotagem e determinação do intervalo de pH em que a atividade das enzimas é mais elevada.

### **28. Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas**

O sobrenadante da cultura de *Bacillus sp.* FT9 que apresentou a maior atividade contra um substrato foi utilizado em um ensaio contra o respectivo substrato para determinar o efeito da temperatura sobre a atividade da enzima. O ensaio foi realizado como descrito no item 26, em pH 7,0 e com diferentes temperaturas de incubação, variando de 30 °C a 90 °C, com intervalos de 10 °C. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e o valor médio foi utilizado para plotagem e determinação do intervalo de temperatura em que a atividade das enzimas é mais elevada.

### **29. Termoestabilidade Enzimática**

Cerca de 1,0 mL de cada sobrenadante das culturas crescidas por 9h em CMC, UCel e XOS foram incubados a diferentes temperaturas (variando de 20 °C a 90 °C, com intervalos de 10 °C), por duas horas. Em seguida foram realizados ensaios enzimáticos contra CMC, UCel e XOS (com o sobrenadante das culturas crescidas em CMC, UCel e XOS, respectivamente) como descrito no item 26 e o resultado

## MÉTODOS

---

comparado com a atividade enzimática encontrada nas mesmas amostras antes da incubação.

### **30. Análise de proteínas em gel desnaturante de Poliacrilamida – SDS PAGE (Sambrook and Russell, 2001)**

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida em um sistema de eletroforese da BioRad®. O preparo dos géis foi realizado adicionando-se as seguintes quantidades dos reagentes.

#### **30.1. Gel Concentrador 4%**

Acrilamida:Bis-acrilamida (28:2)	1,0 mL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	940 µl
Água destilada (q.s.p.)	7,5 mL
SDS 10 % (p/v)	75 µl
APS 10 % (p/v)	40 µl
TEMED	10 µl

#### **30.2. Gel Separador 12%**

Acrilamida:Bis-acrilamida (28:2)	12,0 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	7,5 mL
Água destilada (q.s.p.)	30,0 mL
SDS 10 % (p/v)	300 µl
APS 10 % (p/v)	300 µl
TEMED	15 µl

## MÉTODOS

---

### 30.3. Preparo das amostras

Cerca de 2 mL das amostras dos sobrenadantes das culturas de *Bacillus sp.* FT9 cultivadas por 9h nas diferentes fontes de carbono foram precipitados na presença de 10% de TCA, homogeneizados e incubados em banho de gelo e água por 1 h, em seguida, foram submetidos à centrifugação a 16000 x g, a 4 °C, durante 20 minutos. O sedimento resultante da centrifugação foi lavado em 500 µL de acetona gelada sendo repetida a centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente. O sedimento, resultante da centrifugação após a lavagem com acetona, foi ressuspenso em 30 µL de tampão de amostra para SDS PAGE 1X, fervido durante 5 minutos e aplicado no gel.

### 30.4. Corrida eletroforética

A corrida eletroforética foi realizada em tampão de corrida Tris-Glicina 1X com uma voltagem constante de 6 mV/cm em um sistema de eletroforese vertical.

### 30.5. Coloração com azul de *Coomassie*

As bandas protéicas presentes no gel foram visualizadas após a incubação deste durante duas horas, sob agitação, na solução corante de *Coomassie Blue Coloidal* seguida pela descoloração, incubando o gel durante a noite, sob agitação, em água destilada.

# *Resultados*

## RESULTADOS

---

Considerando toda a biodiversidade de microrganismos inexplorada, a crescente utilização de bactérias termofílicas e de seus produtos em processos industriais e a demanda por tecnologias mais eficientes com um menor custo, duas fontes termais do Parque Nacional de Caldas Novas, Goiás – Brasil, foram selecionadas para estudos relativos à microbiota presente em suas águas. No momento da coleta, o local estava preservado e as fontes emergiam em meio ao solo às margens do rio Quente. A distância entre as duas fontes é de aproximadamente 5 metros e uma grande quantidade de matéria orgânica podia ser encontrada no seu interior. Os resultados apresentados a seguir estão divididos em três partes: Coleta e Seleção, Identificação e Perfil Enzimático.

### **1. COLETA E SELEÇÃO**

O poço termal I possuía temperatura de  $38,8 \pm 0,1$  °C e pH igual a  $6,8 \pm 0,2$  a 10 cm da superfície no momento da coleta. O poço termal II possuía temperatura de  $48,4 \pm 0,1$  °C e pH igual a  $7,0 \pm 0,2$  a 10 cm da superfície no momento da coleta. Nas placas semeadas com a água do poço I cresceram 45 colônias no total, e nas placas com a água do poço II cresceram 32 colônias. Dentre as colônias que apresentaram características semelhantes de cor, tamanho e forma, apenas uma foi selecionada como a representante desse grupo para os estudos seguintes, enquanto as outras foram armazenadas a  $-80,0$  °C com glicerol 25%. Desta maneira, apenas oito colônias foram selecionadas da fonte termal I e cinco colônias foram selecionadas da fonte termal II, estes isolados foram denominados FT1 a FT13 (Tabela 1).

# RESULTADOS

---

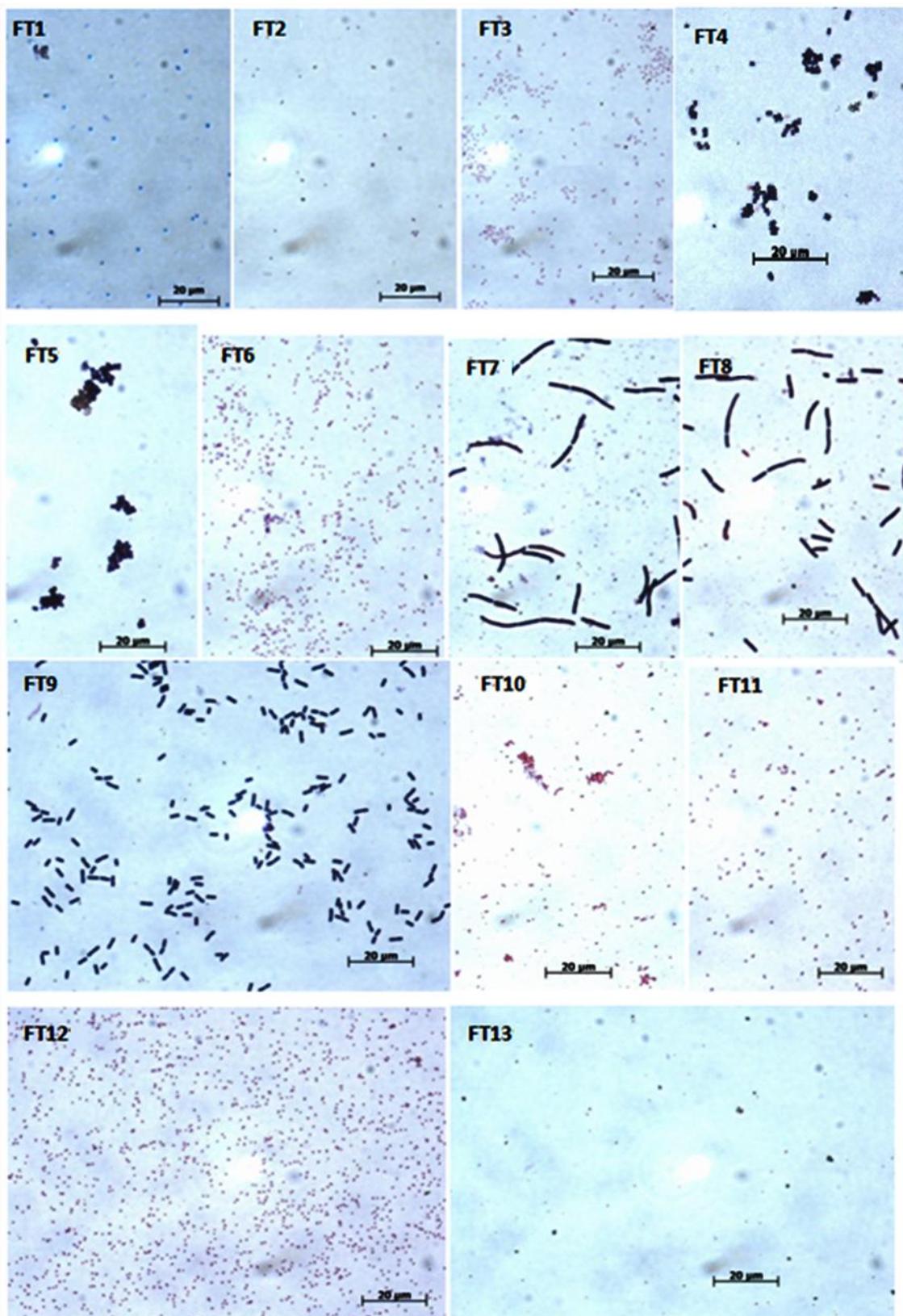
## 1.1. Coloração de Gram

Após o isolamento, as estirpes selecionadas, em fase logarítmica, foram fixadas e coradas pelo método diferencial de Gram (Figura 4) e analisadas quanto à forma e a resposta à coloração de Gram, segundo consta na Tabela 1. Entre as treze bactérias isoladas, cinco apresentam a forma de cocos Gram positivos, cinco são bacilos Gram negativos e três são bacilos Gram positivos, sendo que os bacilos Gram negativos são menores do que os demais bacilos.

**Tabela 2.** Caracterização das bactérias isoladas da água das fontes termais I e II quanto à forma e a resposta a coloração de Gram.

<b>Isolado</b>	<b>Fonte Termal</b>	<b>Forma</b>	<b>Gram</b>
<b>FT1</b>	<b>I</b>	<b>Coco</b>	<b>Positivo</b>
<b>FT2</b>	<b>I</b>	<b>Coco</b>	<b>Positivo</b>
<b>FT3</b>	<b>I</b>	<b>Bacilo</b>	<b>Negativo</b>
<b>FT4</b>	<b>I</b>	<b>Coco</b>	<b>Positivo</b>
<b>FT5</b>	<b>I</b>	<b>Coco</b>	<b>Positivo</b>
<b>FT6</b>	<b>I</b>	<b>Bacilo</b>	<b>Negativo</b>
<b>FT7</b>	<b>I</b>	<b>Bacilo</b>	<b>Positivo</b>
<b>FT8</b>	<b>I</b>	<b>Bacilo</b>	<b>Positivo</b>
<b>FT9</b>	<b>II</b>	<b>Bacilo</b>	<b>Positivo</b>
<b>FT10</b>	<b>II</b>	<b>Bacilo</b>	<b>Negativo</b>
<b>FT11</b>	<b>II</b>	<b>Bacilo</b>	<b>Negativo</b>
<b>FT12</b>	<b>II</b>	<b>Bacilo</b>	<b>Negativo</b>
<b>FT13</b>	<b>II</b>	<b>Coco</b>	<b>Positivo</b>

## RESULTADOS



**Figura 4:** Microscopia óptica com aumento de 840x de amostras das bactérias isoladas das fontes termais I e II fixadas e coradas pelo método de Gram. A numeração das fotos corresponde a numeração da Tabela 1, e a barra da escala corresponde a 20 µm.

## RESULTADOS

---

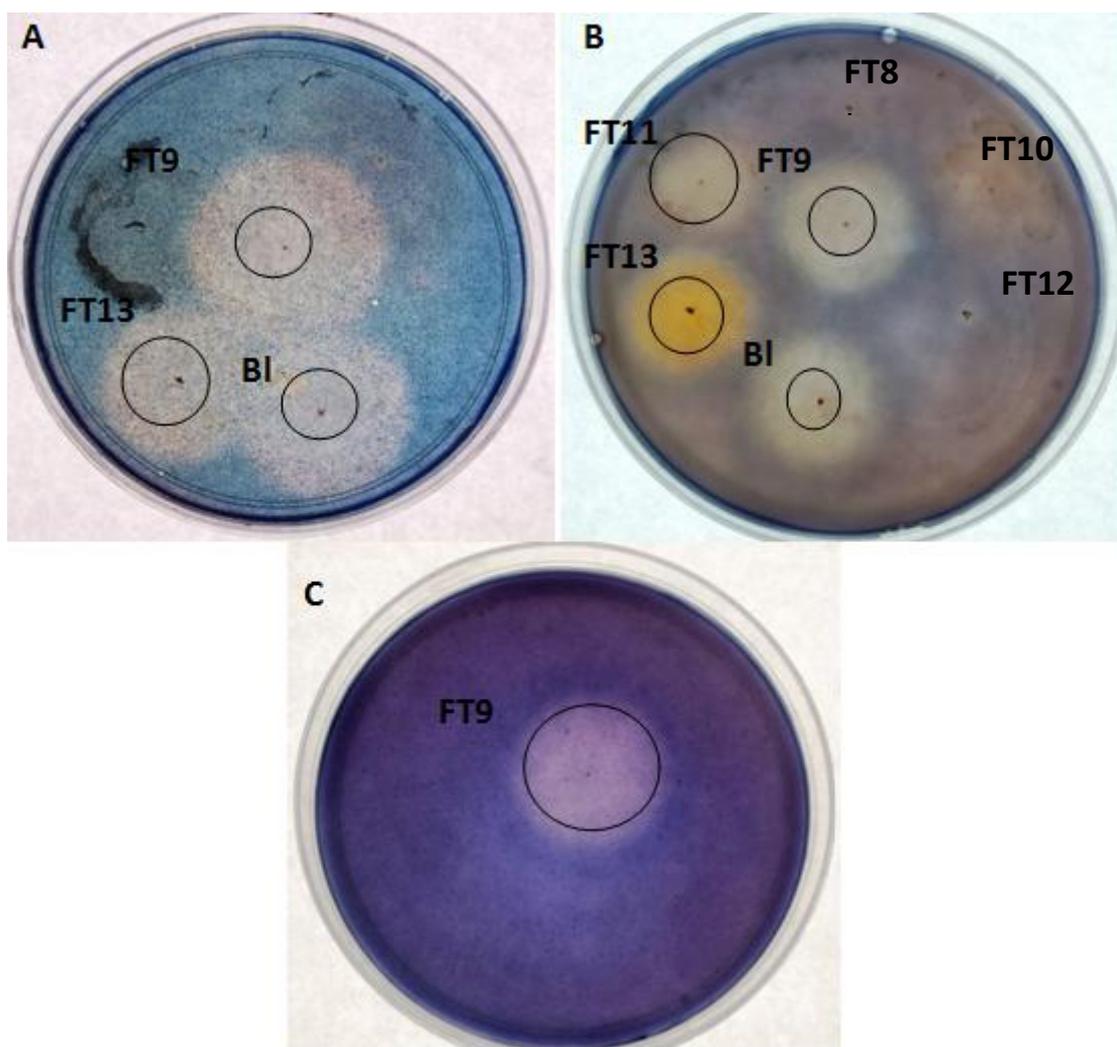
Para seleção da estirpe de maior interesse quanto à atividade enzimática contra celulose e xilana e quanto ao crescimento a altas temperaturas, dois experimentos de varredura foram realizados com as treze linhagens independentes, o primeiro para a atividade celulolítica e xilanolítica em placa e o segundo para a determinação da atividade ótima de crescimento em meio líquido das bactérias isoladas.

### 1.2. Seleção por atividade enzimática

As treze linhagens selecionadas (FT1 a FT13) foram cultivadas em meio M9 ágar contendo uma única fonte de carbono (CMC, UCel ou Xilana *Oat Spelts*) para analisar a sua capacidade de crescer e degradar tais substratos (Figura 5). Uma colônia de *B. liqueniformis* linhagem B-41361 foi utilizada como controle positivo para a hidrólise de CMC e Xilana.

Todas as bactérias isoladas apresentaram crescimento em CMC e xilana, mas apenas a estirpe FT9 cresceu em UCel e apresentou halo de hidrólise visível em todos os substratos, enquanto que a estirpe FT13 apresentou halo em CMC e em xilana e a estirpe FT11 apenas em xilana (Figura 5).

## RESULTADOS

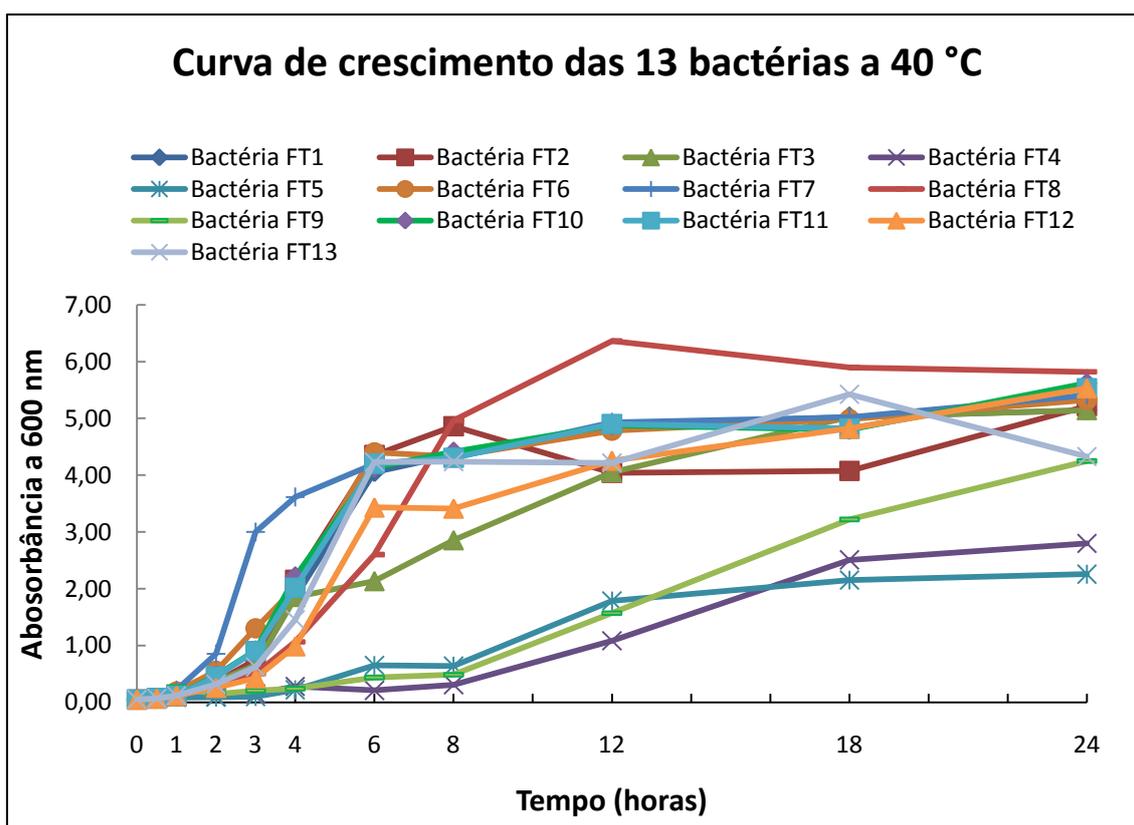


**Figura 5:** Formação de halos de hidrólise em meio M9 ágar contendo uma única fonte de carbono. Em **A**, CMC. Em **B**, Xilana. E em **C**, Celulose microcristalina. As áreas das colônias originais estão demarcadas com os círculos pretos e o número correspondente a denominação da estirpe escrito no seu canto superior esquerdo. Foi utilizado como controle positivo para CMC e Xilana o *B. liqueniformis* B-41361 (BI).

### 1.3. Seleção por temperatura de crescimento

Para a avaliação da faixa de temperatura de crescimento das bactérias, estas foram cultivadas em meio LB sob agitação de 200 rpm a 40 °C e pH 7,0. A densidade celular foi observada pela leitura da absorbância a 600 nm de amostras da cultura retiradas nos tempos indicados (Figura 6).

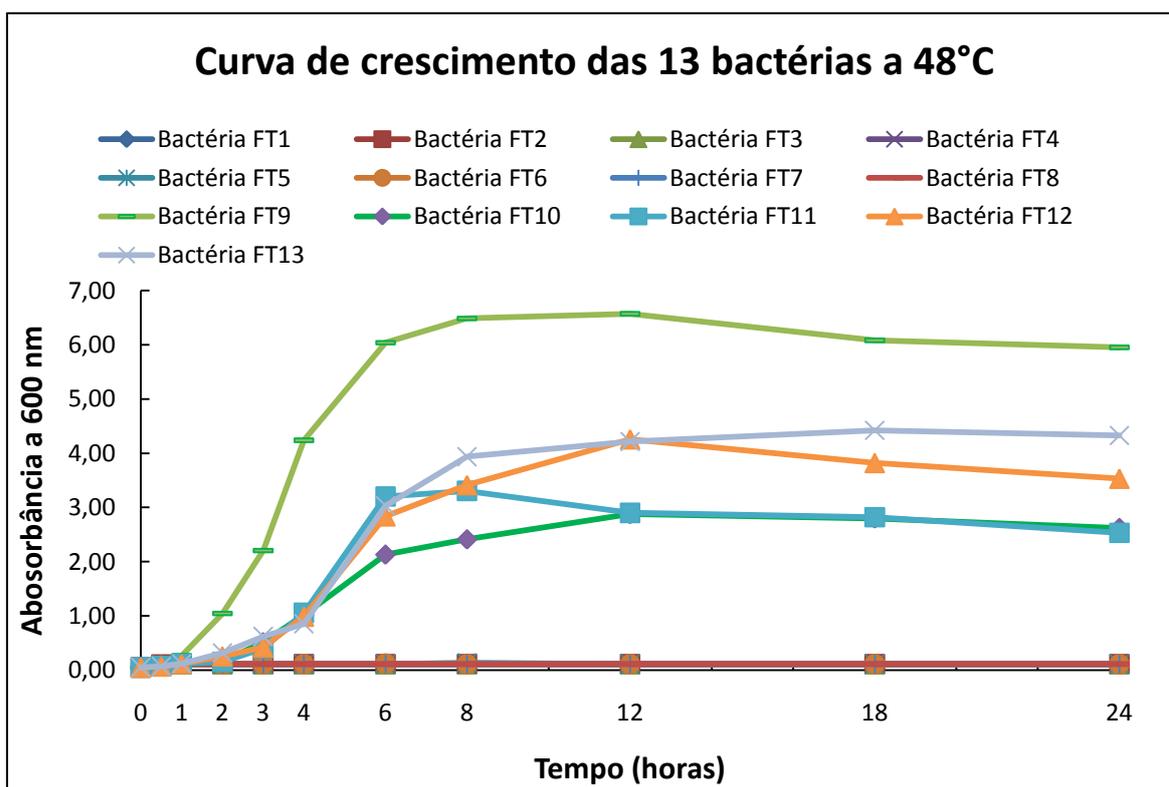
## RESULTADOS



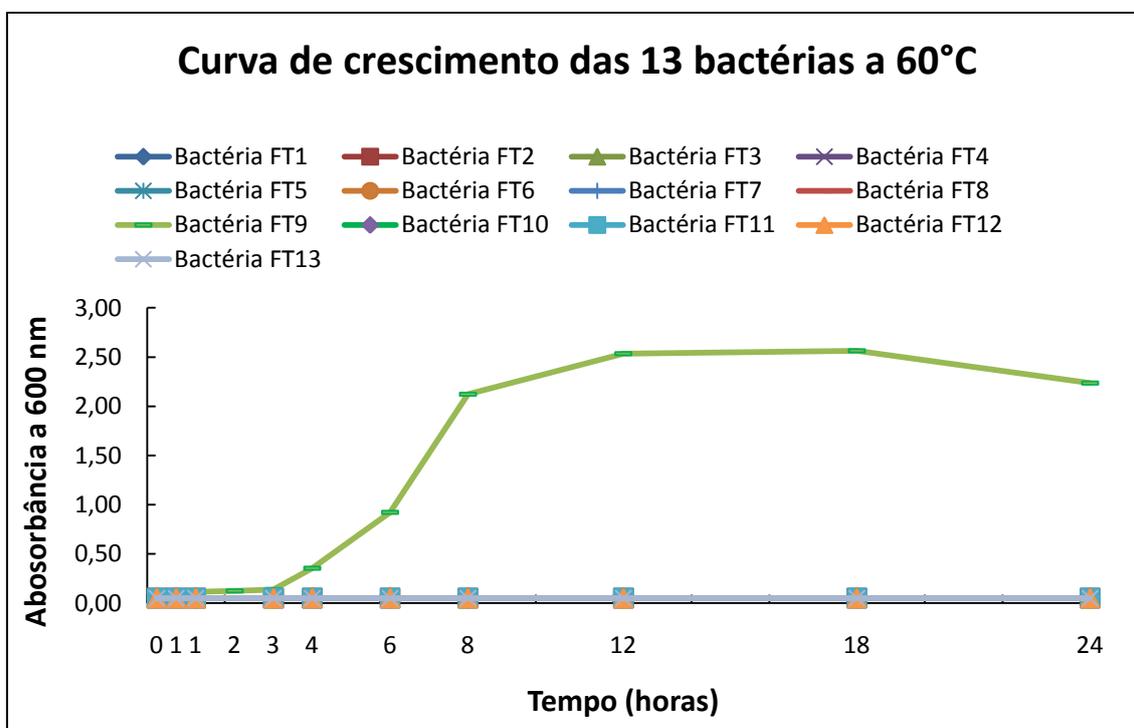
**Figura 6:** Curva de crescimento das 13 bactérias selecionadas das fontes termais I e II em meio complexo a 40 °C. A Absorbância a 600nm foi medida para os tempos indicados. Cada símbolo com o número da bactéria está indicado na legenda acima.

O coeficiente angular da regressão linear da fase exponencial das curvas de crescimento foi calculado como o coeficiente angular de crescimento específico ( $\alpha$ ) de todas as bactérias. A 40 °C, as linhagens FT3, FT4, FT5 e FT9 apresentaram um  $\alpha$  menor do que as demais (Tabela 3). Em seguida, o mesmo experimento foi realizado alterando-se a temperatura para 48 °C (Figura 7). Como pode ser observado, as bactérias FT1 à FT8 não apresentaram aumento da densidade celular durante o experimento e as demais cresceram com um  $\alpha$  menor do que a 40 °C, exceto a bactéria FT9 que aumentou o coeficiente angular de 0,119 a 40 °C para 0,638 a 48 °C (Tabela 3).

## RESULTADOS



**Figura 7:** Curva de crescimento das 13 bactérias em meio complexo a 48 °C. A Absorbância a 600nm foi medida para os tempos indicados. Cada símbolo com o número da bactéria está indicado na legenda acima.



**Figura 8:** Curva de crescimento das 13 bactérias em meio complexo a 60 °C. A Absorbância a 600nm foi medida para os tempos indicados. Cada símbolo com o número da bactéria está indicado na legenda acima.

## RESULTADOS

---

Para determinar o limite da faixa de temperatura de crescimento das bactérias, o mesmo experimento foi realizado a 60 °C, mantendo-se todas as outras condições inalteradas. Como é apresentado na figura 8, apenas a bactéria FT9 apresentou crescimento a 60 °C, embora o seu coeficiente angular de crescimento específico tenha sido menor do que a 48 °C (Tabela 3).

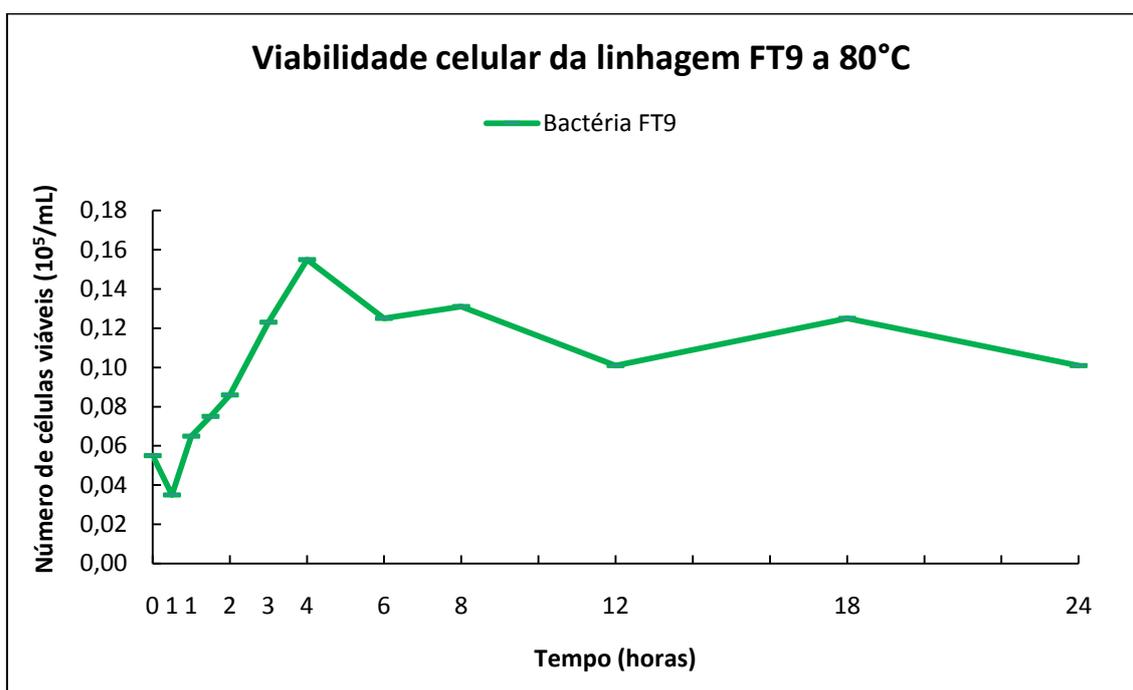
**Tabela 3:** Coeficiente angular de crescimento específico ( $\alpha$ ) das bactérias isoladas nas fontes termais I e II quando cultivadas em meio complexo a 40 °C, 48 °C e 60 °C.

<b>Bactéria</b>	<b>Coeficiente angular de crescimento específico (<math>\alpha</math>)</b>		
	<b>40°C</b>	<b>48°C</b>	<b>60°C</b>
<b>FT1</b>	<b>0,488</b>	<b>Nulo</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT2</b>	<b>0,523</b>	<b>Nulo</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT3</b>	<b>0,170</b>	<b>Nulo</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT4</b>	<b>0,111</b>	<b>Nulo</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT5</b>	<b>0,071</b>	<b>Nulo</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT6</b>	<b>0,484</b>	<b>Nulo</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT7</b>	<b>0,691</b>	<b>Nulo</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT8</b>	<b>0,344</b>	<b>Nulo</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT9</b>	<b>0,119</b>	<b>0,638</b>	<b>0,196</b>
<b>FT10</b>	<b>0,476</b>	<b>0,271</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT11</b>	<b>0,485</b>	<b>0,476</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT12</b>	<b>0,517</b>	<b>0,446</b>	<b>Nulo</b>
<b>FT13</b>	<b>0,507</b>	<b>0,505</b>	<b>Nulo</b>

A bactéria FT9 apresentou a mais elevada faixa de temperatura de crescimento, variando de 40 °C a 60 °C. Para verificar se a bactéria FT9 seria capaz de crescer a temperaturas mais altas, um último experimento foi realizado para determinar a resistência dessa bactéria a altas temperaturas. Nas mesmas condições dos ensaios

## RESULTADOS

anteriores, aumentou-se a temperatura de cultivo para 80 °C, e a bactéria FT9 não apresentou crescimento significativo. Para verificar se houve inibição de crescimento ou morte celular causada pelo aumento da temperatura, amostras da cultura foram coletadas em diferentes períodos de cultivo, plaqueadas em meio complexo e incubadas a 48 °C, estimando-se o número de células viáveis da bactéria FT9 em cada tempo de incubação a 80 °C (Figura 9).



**Figura 9:** Viabilidade celular da bactéria FT9 a 80 °C. Amostras da cultura incubada a 80 °C durante os tempos indicados foram coletadas, plaqueadas em meio complexo e cultivadas a 48 °C. A quantidade de células viáveis em 1 mL de cultura incubada a 80 °C foi estimada pelo número de colônias que apresentaram crescimento nas placas a 48 °C.

Apesar de não apresentar crescimento nesta temperatura, a bactéria FT9 manteve a viabilidade celular durante o período de 24h de incubação. Como esta bactéria também apresentou os melhores resultados quanto à hidrólise de celulose e xilana (Figura 5), esta linhagem foi selecionada para as etapas seguintes deste trabalho, ser identificada e caracterizada quanto ao perfil enzimático.

## RESULTADOS

---

### 2. IDENTIFICAÇÃO

A análise morfológica do teste de Gram indicou que a bactéria FT9 pode pertencer ao gênero *Bacillus*. Para confirmar esta hipótese, uma cultura de dez dias foi corada para a visualização de endósporos. Na microscopia dessa coloração foram observados endósporos que não distorcem o esporângio e apresentam-se na região subterminal (Figura 10).



**Figura 10.** Microscopia ótica com aumento de 1000x de uma colônia de 10 dias da bactéria FT9 corada para a visualização de endósporos. As setas vermelhas indicam alguns dos endósporos visíveis.

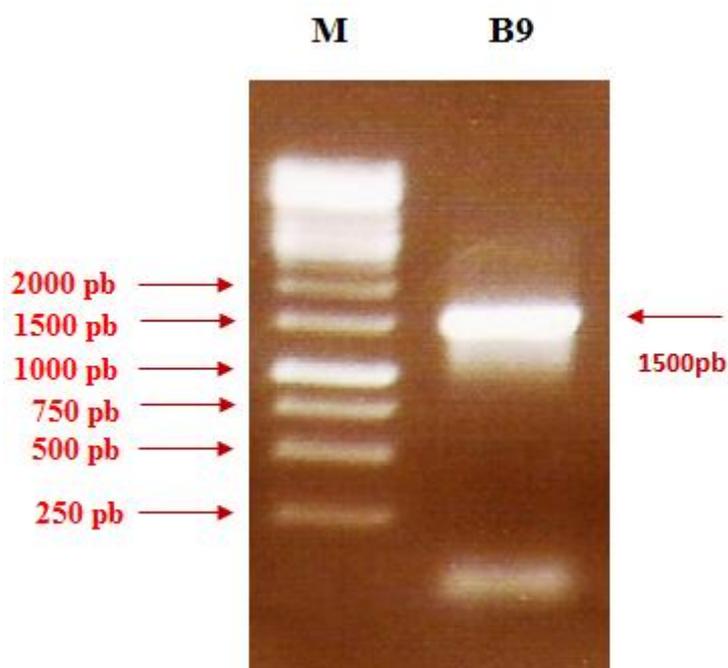
#### 2.1. Análises do *locus* gênico que codifica o rRNA 16S.

Para a confirmação da classificação da bactéria FT9 dentro do gênero *Bacillus*, o DNA genômico foi extraído e em seguida uma PCR foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para o *locus* gênico do RNA ribossomal 16S (R16SA e R16SB), amplificando um fragmento de aproximadamente 1500 pb (Figura 11).

## RESULTADOS

---

O fragmento amplificado foi purificado e seqüenciado com os mesmos iniciadores da PCR, com três repetições para cada iniciador, gerando um total de 6 seqüências. Estas foram analisadas e sobrepostas para a formação da seqüência mais provável pelo *CAP3 Assembly Program* distribuído pela *Michigan Tech* (Huang and Madan, 1999).



**Figura 11.** Análise eletroforética de produto de PCR em gel de agarose 0,8%. A esquerda (M) o marcador de massa molecular 1 kb da LGCBIO. A direita (B9) o produto da PCR da linhagem FT9 com os iniciadores para o gene do rDNA 16S.

A seqüência foi comparada com o banco de dados do *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2005, Cole *et al.*, 2007, Cole *et al.*, 2009) confirmando com 100% de precisão que a linhagem FT9 pertence ao gênero *Bacillus* (Figura 12). Entretanto, a espécie não pôde ser confirmada utilizando apenas a seqüência do rRNA 16S, alguns grupos dentro desse gênero possuem uma baixa taxa de polimorfismo para esse gene como, por exemplo o grupo do *B. subtilis* (Shaver *et al.*, 2002) e o grupo do *B. cereus* (Bavykin *et al.*, 2004, Helgason *et al.*, 2000).

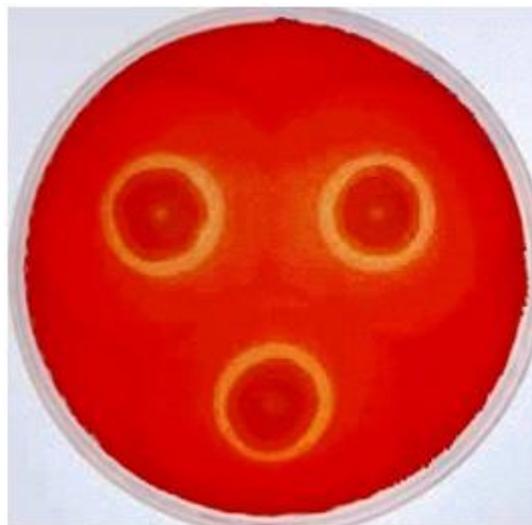


## RESULTADOS

---

diferença genética entre as três espécies que compõem esse grupo (Helgason *et al.*, 2000), mas alguns marcadores moleculares são sugeridos e podem conduzir à diferenciação entre as espécies, como o gene da RNA polimerase (Qi *et al.*, 2001) ou da DNA girase (Bavykin *et al.*, 2004). Fatores bioquímicos e imunológicos como hemólise, resistência a antibióticos ou proteínas específicas de membrana também podem auxiliar na identificação, assim como estudos sobre o nicho ecológico da bactéria (Vilas-Boas *et al.*, 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define alguns procedimentos que devem ser seguidos em caso de suspeita de *B. anthracis*, seguindo o protocolo adotado pela Agência de Proteção da Saúde do Reino Unido (HPA, 2007), a bactéria FT9 foi cultivada em meio ágar-sangue e o aspecto morfológico da colônia avaliado (Figura 13).



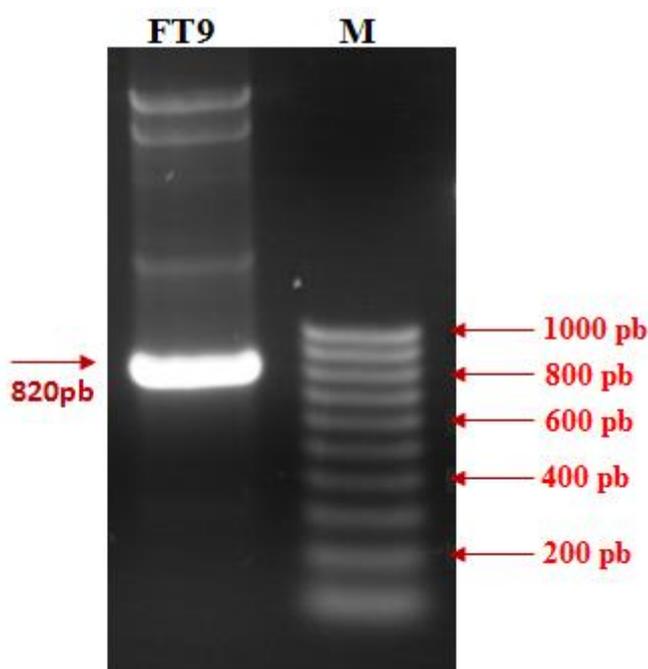
**Figura 13:** Cultivo da bactéria FT9 em meio ágar-sangue após 48h de incubação a 42 °C.

Devido à formação de um halo  $\beta$ -hemolítico, esta bactéria não possui indícios de pertencer à espécie *B. anthracis* (HPA, 2007).

## RESULTADOS

### 2.2. Análises do *locus* gênico que codifica a subunidade $\beta$ da RNA polimerase.

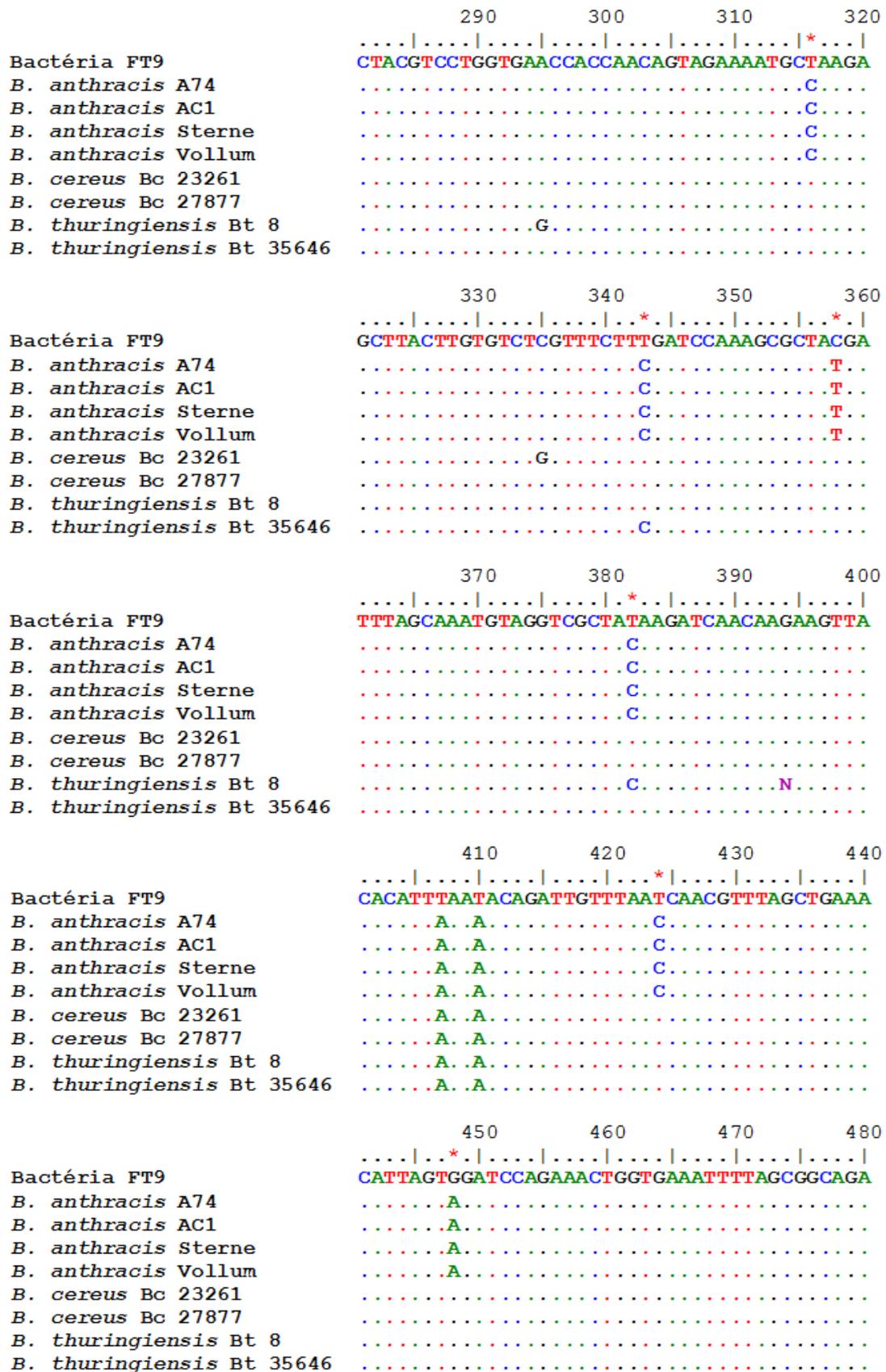
Para tentar identificar a espécie, uma nova reação de PCR foi realizada utilizando um par de iniciadores (RPOb1 e RPOb2) específico para o *locus* gênico da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase de *Bacillus* (Qi *et al.*, 2001), amplificando um fragmento de aproximadamente 820pb (Figura 14).



**Figura 14.** Análise eletroforética de produto de PCR em Gel de agarose 0,8%. A direita (M) o marcador de peso molecular 100pb da LGCBIO. A esquerda (FT9) o produto da PCR da bactéria FT9 com os iniciadores para o gene da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase.

O fragmento amplificado foi purificado e seqüenciado com os mesmos iniciadores da PCR, com quatro repetições para cada iniciador, gerando um total de 8 seqüências. Estas foram analisadas e sobrepostas para a formação da seqüência mais provável pelo *CAP3 Assembly Program* distribuído pela *Michigan Tech* (Huang and Madan, 1999), só foi possível seqüenciar com qualidade 505pb (Figura 15).

# RESULTADOS



**Figura 15.** Alinhamento da base 280 à base 480 da sequência de 505 pb do locus gênico da subunidade β da RNA polimerase da bactéria FT9 com diferentes linhagens de *B. Anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis*. As bases marcadas (\*) são polimórficas nas linhagens de *B. Anthracis*, e conservadas nas linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis*.

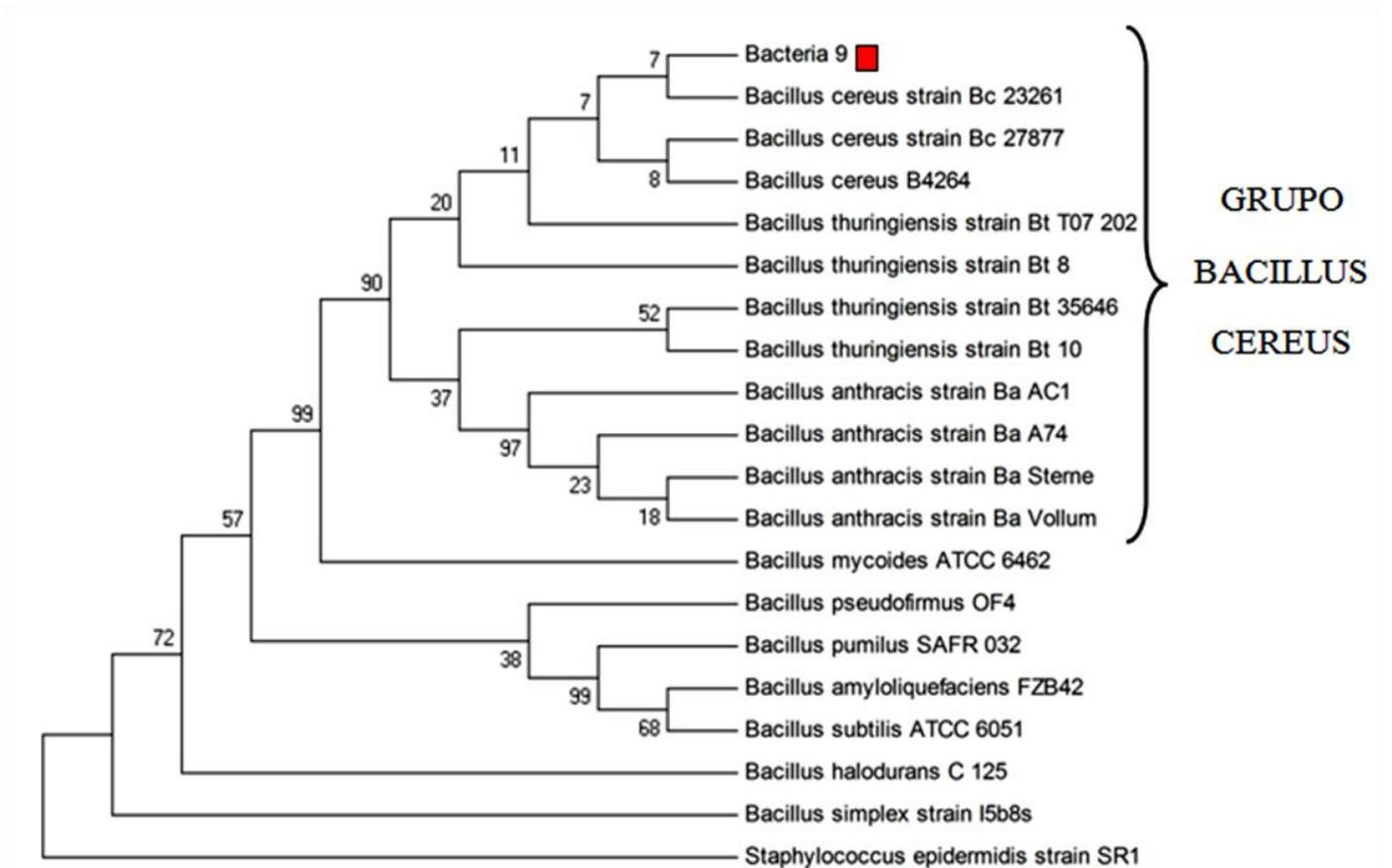
## RESULTADOS

---

A sequência obtida foi alinhada com oito sequências do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), quatro linhagens de *B. anthracis* (linhagens A74, AC1, Sterne e Vollum), duas linhagens de *B. cereus* (linhagens Bc 23261 e Bc 27877) e duas linhagens de *B. thuringiensis* (linhagens Bt 8 e Bt 35646). As linhagens de *B. anthracis* possuem seis pares de bases conservados dentro dessa região que o diferem de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, podendo ser usadas como marcadores para a espécie (Qi *et al.*, 2001). De acordo com a figura 15, a sequência correspondente a bactéria FT9 possui maior similaridade com as sequências das diferentes linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, excluindo a possibilidade da bactéria FT9 ser classificada como *B. anthracis*.

Análises filogenéticas dessa sequência realizadas com o programa *MEGA* versão 4 (Tamura K. *et al.*, 2007) confirmam a classificação da bactéria 9 dentro do grupo do *Bacillus cereus* (Figura 16), mas não diferencia entre as espécies *B. cereus* e *B. thuringiensis*. Uma possibilidade de diferenciação entre essas duas espécies é a capacidade de produção de proteína cristal, que caracteriza as linhagens de *B. thuringiensis*. Para tanto, lâminas a fresco de culturas com 12 h, 24 h e 48 h de incubação em meio LB a 48 °C sem coloração e coradas com uma solução de Comassie Blue foi realizada para identificar proteínas cristal, mas o resultado foi negativo, não sendo suficiente para excluir a possibilidade da bactéria FT9 pertencer à espécie *B. thuringiensis*. Assim sendo, ela passará a ser referida como *Bacillus sp* FT9.

## RESULTADOS



**Figura 16.** Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase das bactérias citadas. Em destaque a linhagem FT9, enquadrada no grupo do *B. cereus*. Os algarismos representam o resultado do teste de *bootstrap* com 1000 repetições em porcentagem.

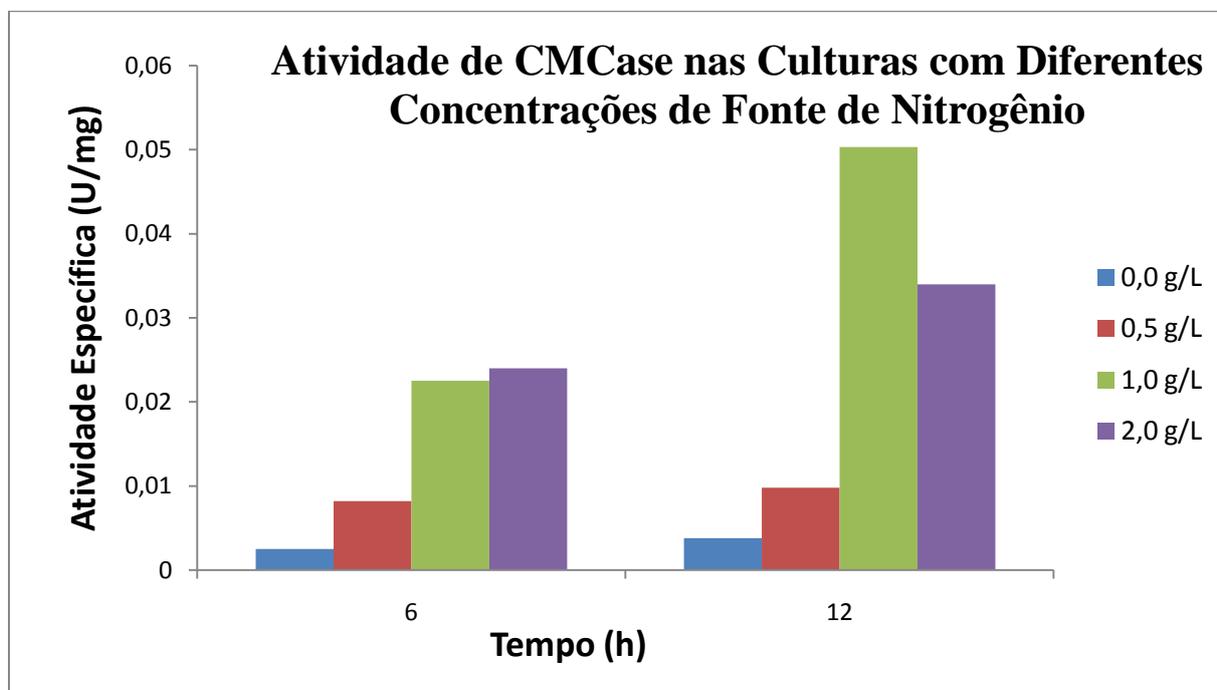
## RESULTADOS

### 3. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO

Na seleção inicial, a bactéria *Bacillus sp.* FT9 apresentou atividade sobre celulose microcristalina, carboximetilcelulose e xilana. Com a intenção de melhor caracterizar estas atividades, a bactéria foi crescida em meio definido M9S contendo diferentes fontes de carbono, porém foi necessário otimizar a concentração da fonte de nitrogênio para aumentar a eficiência dos ensaios.

#### 3.1. Cultivos em diferentes fontes de carbono.

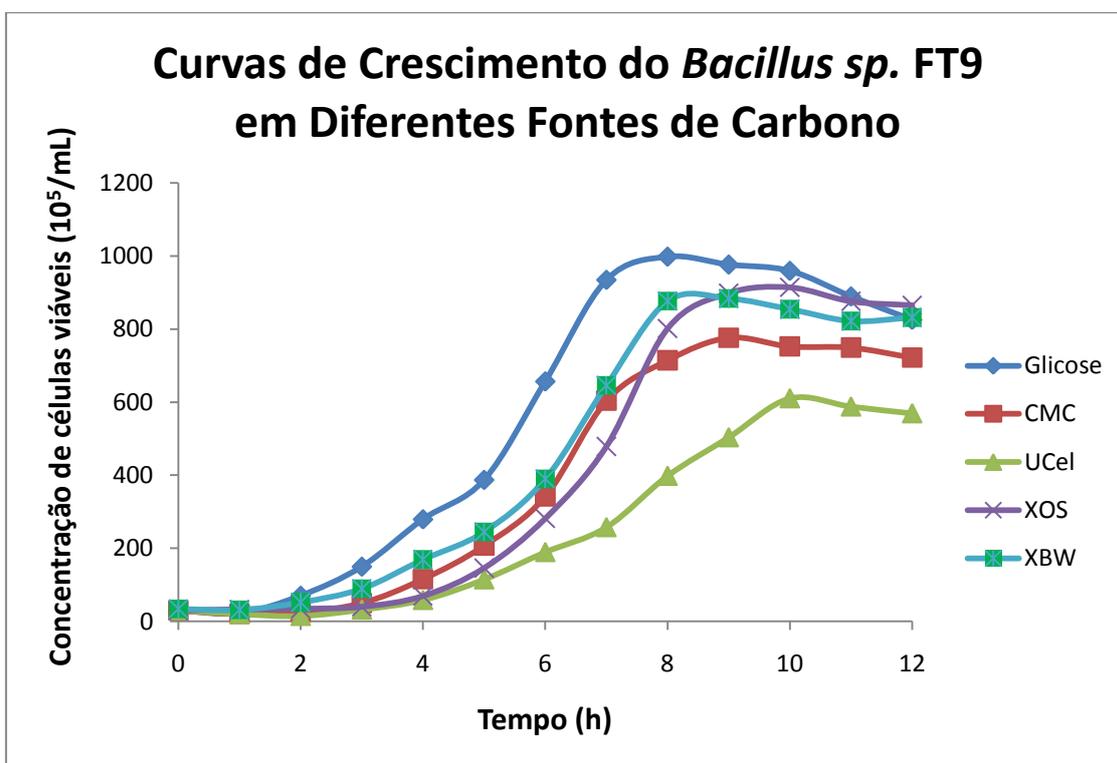
Quatro culturas do *Bacillus sp.* FT9 foram realizadas em meio M9S com CMC sob as mesmas condições (48 °C, agitação de 300 rpm e pH 7,0) alterando-se apenas a concentração da fonte de nitrogênio (extrato de levedura) de 0,0 g/L a 2,0 g/L. Após 6 h e 9 h de incubação, a atividade específica de CMCase foi avaliada no sobrenadante (Figura 17).



**Figura 17:** Gráfico da atividade específica de CMCase presente no sobrenadante da cultura de *Bacillus sp.* FT9 induzida por CMC com diferentes concentrações de fonte de nitrogênio como indicado na legenda à direita.

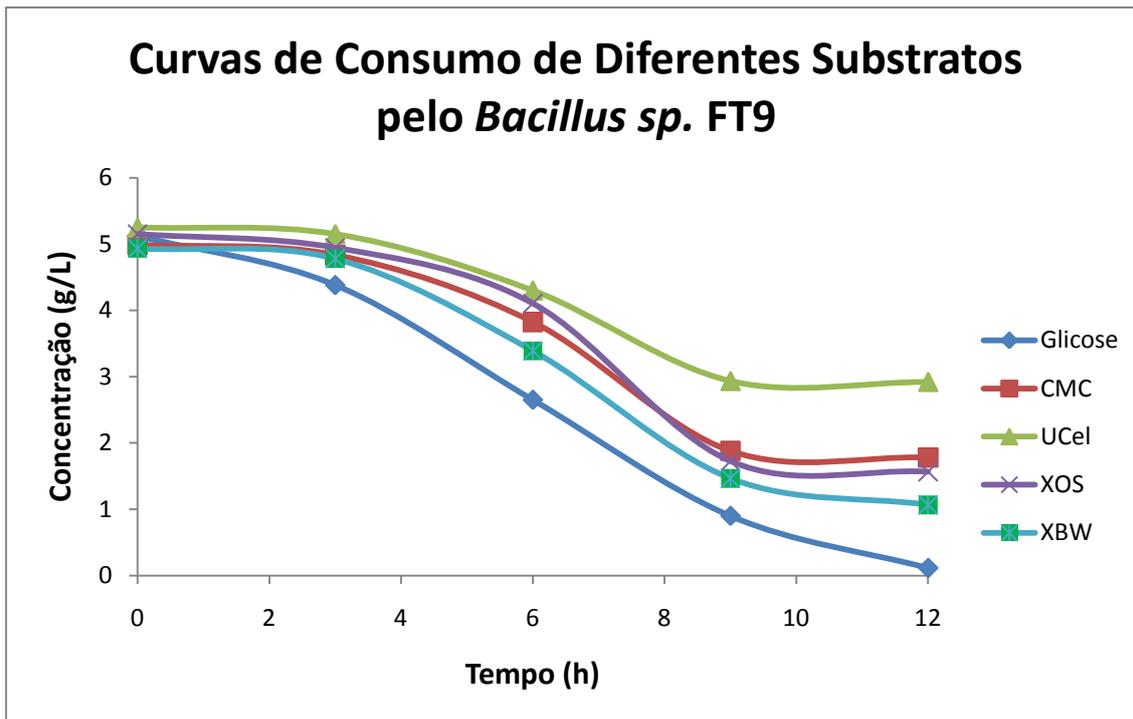
## RESULTADOS

O melhor rendimento celular foi obtido com uma concentração de extrato de levedura de 1,0 g/L. Uma vez definida a melhor concentração da fonte de nitrogênio, foram realizadas cinco fermentações com o *Bacillus sp* FT9 em um biorreator com volume final de 1000mL, à temperatura de 48 °C e pH igual a 7,0, sob agitação de 300 rpm. Em cada fermentação alterou-se apenas a fonte de carbono entre Glicose, Carboximetilcelulose (CMC), Celulose Ultracristalina (UCel), Xilana *Oat Spelts* (XOS) e Xilana *Birchwood* (XBW). Amostras da cultura foram coletadas a cada hora, o número de células viáveis foi estimado por plaqueamento (Figura 18) e a concentração dos substratos no meio foi calculada por hidrólise ácida e dosagem de açúcar redutor (Figura 19).



**Figura 18:** Curvas de crescimento do *Bacillus sp* FT9 em meio M9S variando a fonte de carbono de acordo com a legenda à direita. O número de células viáveis foi estimado por plaqueamento de uma alíquota da cultura nos tempos indicados.

## RESULTADOS



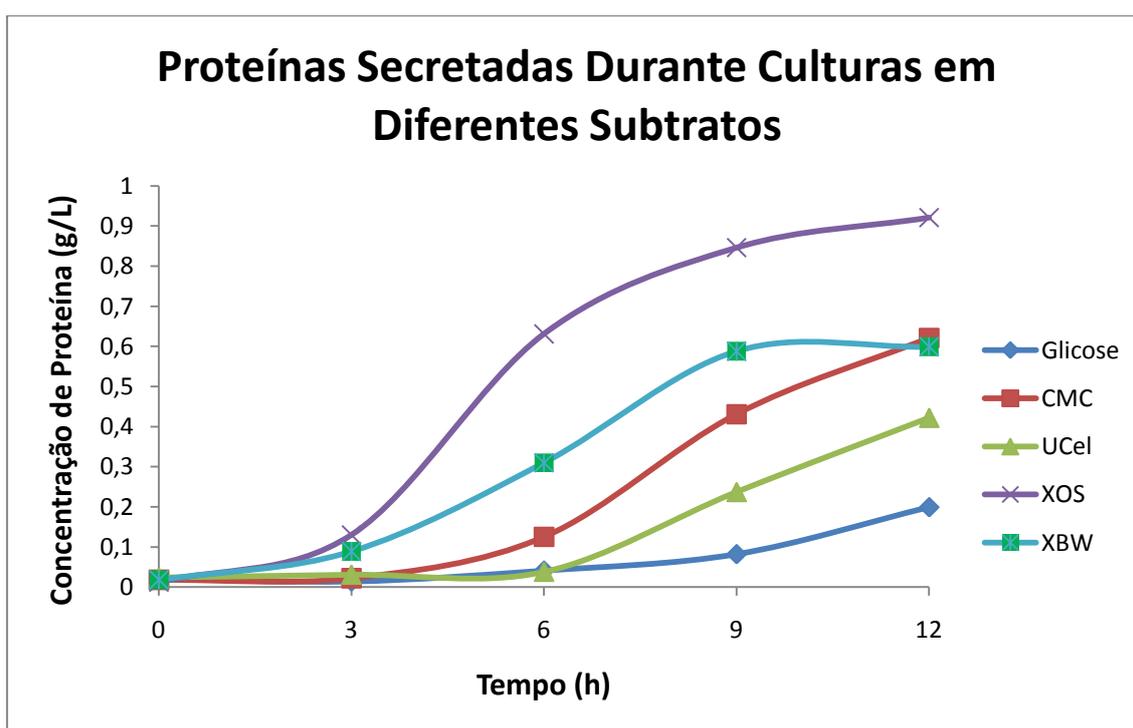
**Figura 19:** Curvas de consumo de diferentes substratos pelo *Bacillus sp.* FT9 durante fermentações a 48 °C. Os substratos estão indicados na legenda à direita. A concentração dos substratos complexos foi estimada pela técnica de hidrólise ácida.

A quantidade inicial de células viáveis presentes em todas as culturas foi de aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/mL. Nas fermentações em CMC, XOS e XBW, o *Bacillus sp.* FT9 iniciou a fase exponencial entre 3 h e 4 h após o início da incubação e entrou em fase estacionária entre 8 h e 9 h de cultivo com a concentração final de células viáveis de aproximadamente  $7,8 \times 10^7$ ,  $9,1 \times 10^7$  e  $8,8 \times 10^7$  células/mL respectivamente. Na fermentação em glicose, o *Bacillus sp.* FT9 iniciou a fase exponencial entre 1 h e 2 h após o início da incubação e atingiu a fase estacionária entre 7 h e 8 h com  $1,0 \times 10^8$  células/mL. E na fermentação em UCel, o *Bacillus sp.* FT9 iniciou a fase exponencial entre 4 h e 5 h após o início da incubação e entrou em fase estacionária após 10 h de fermentação, sendo que a concentração final de células viáveis dessa cultura foi aproximadamente de 70% da média da concentração final de células viáveis das demais culturas (Figura 18).

## RESULTADOS

A glicose foi o substrato que começou a ser consumido mais rapidamente, entre 0 h e 3 h após o início da cultura e o único substrato a ser totalmente consumido ao final das 12 h de fermentação. CMC, XOS, XBW e UCel começaram a ser consumidos entre 3 h e 6 h após o início da incubação e não foram mais degradados após 9 h de cultivo. Ao final das 12 h de fermentação, a bactéria FT9 havia consumido aproximadamente 79% de XBW, 69% de XOS, 65% de CMC e 41% de UCel (Figura 19).

Para analisar a eficiência das fermentações, o total de proteínas secretadas para o sobrenadante ao decorrer dos cultivos foi estimado pelo método de Bradford (Figura 20).



**Figura 20:** Total de proteínas secretadas durante as fermentações com diferentes substratos. A concentração de proteínas no sobrenadante das culturas crescidas em glicose, CMC, UCel, XOS e XBW (como indicado na legenda à direita) foi calculada pelo Método de Bradford. O sobrenadante foi coletado nos tempos indicados.

## RESULTADOS

As culturas crescidas em xilana apresentaram proteínas no sobrenadante entre 0h e 3 h do início da incubação, enquanto que a cultura com CMC apresentou proteínas no sobrenadante entre 3 h e 6 h após o início do cultivo e as culturas com Ucel e glicose apresentaram proteínas no sobrenadante entre 6 h e 9 h de cultivo. Ao final das 12 h de fermentação, foram obtidas concentrações finais de proteínas no sobrenadante da cultura de 0,92 g/L em XOS, de 0,60 g/L em XBW, de 0,62 g/L em CMC, de 0,42 g/L em Ucel e de 0,20 g/L em glicose (Figura 20).

Para comparar as fermentações nos diferentes substratos foram calculados a taxa de crescimento específico ( $\mu$ ), o rendimento em número de células relativo ao substrato (Y), o rendimento em proteínas secretadas relativo ao substrato (P) e o rendimento em proteínas secretadas relativo ao número de células (R) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Taxa de crescimento específico para cada substrato ( $\mu$ ) e rendimentos das culturas do *Bacillus sp.* FT9 com diferentes fontes de carbono.

Substrato	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Y ( $10^8$ células/ $g_s$ )	P ( $g_p/g_s$ )	R ( $10^{-12} g_p/célula$ )
Glicose	0,646	118,8	0,0098	0,82
CMC	0,559	122,8	0,0692	5,63
Ucel	0,468	106,4	0,0465	4,37
XOS	0,566	133,4	0,1112	8,34
XBW	0,524	119,7	0,0753	6,29

Na Tabela é apresentado o rendimento em número de células relativo ao substrato (Y), o rendimento em proteínas secretadas relativo ao substrato (P) e o rendimento em proteínas secretadas relativo ao número de células (R). A unidade “ $g_s$ ” indica um grama de substrato e “ $g_p$ ” indica um grama de proteína.

## RESULTADOS

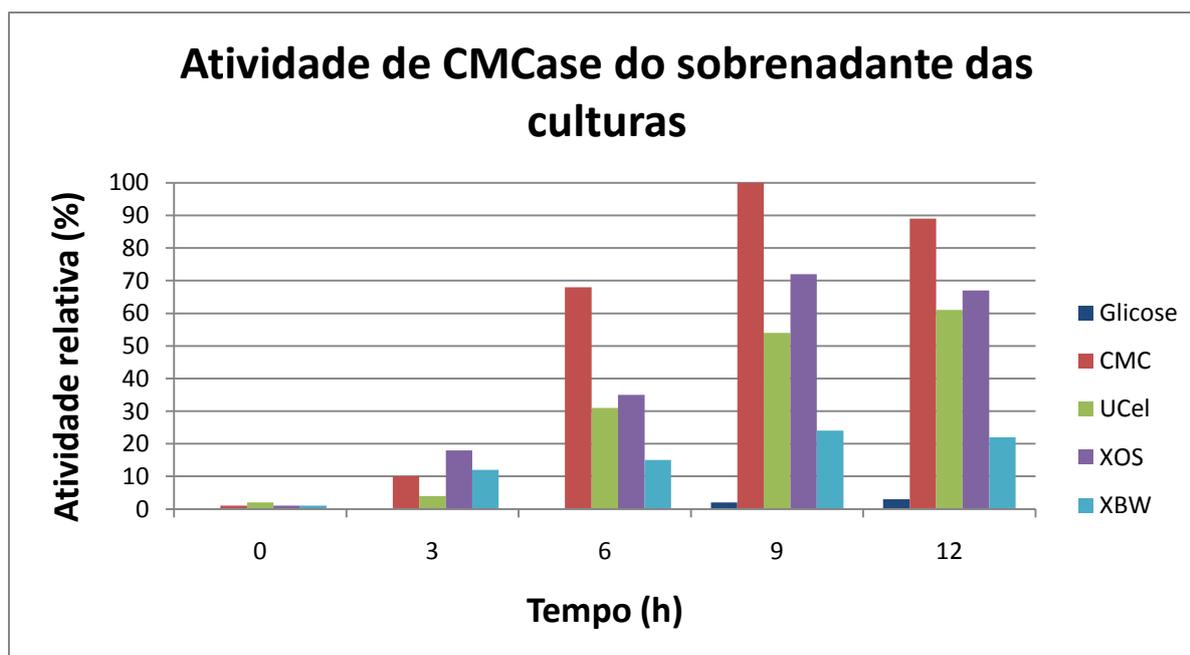
---

A cultura do *Bacillus sp* FT9 em glicose apresentou a maior taxa de crescimento específico,  $0,646 \text{ h}^{-1}$ , embora também tenha apresentado os menores valores para os rendimentos em produção de proteínas secretadas, P e R. A cultura com CMC apresentou valores medianos de rendimento e uma taxa de crescimento específico igual a  $0,559 \text{ h}^{-1}$ . A cultura com UCel apresentou a taxa de crescimento específico mais baixa entre as amostras analisadas, igual a  $0,468 \text{ h}^{-1}$ , e os menores valores de rendimento entre as culturas em substratos complexos. O *Bacillus sp.* FT9 apresentou a maior taxa de crescimento específico entre as culturas com substratos complexos quando cultivado em XOS,  $0,566 \text{ h}^{-1}$ , apresentando, também nesse substrato, os maiores valores de Y, P e R. E quando cultivado com XBW, o *Bacillus sp.* FT9 apresentou um  $\mu$  menor do que quando cultivado com XOS,  $0,524 \text{ h}^{-1}$ , assim como os valores de Y, P e R também foram inferiores, mas superiores aos demais substratos (Tabela 3).

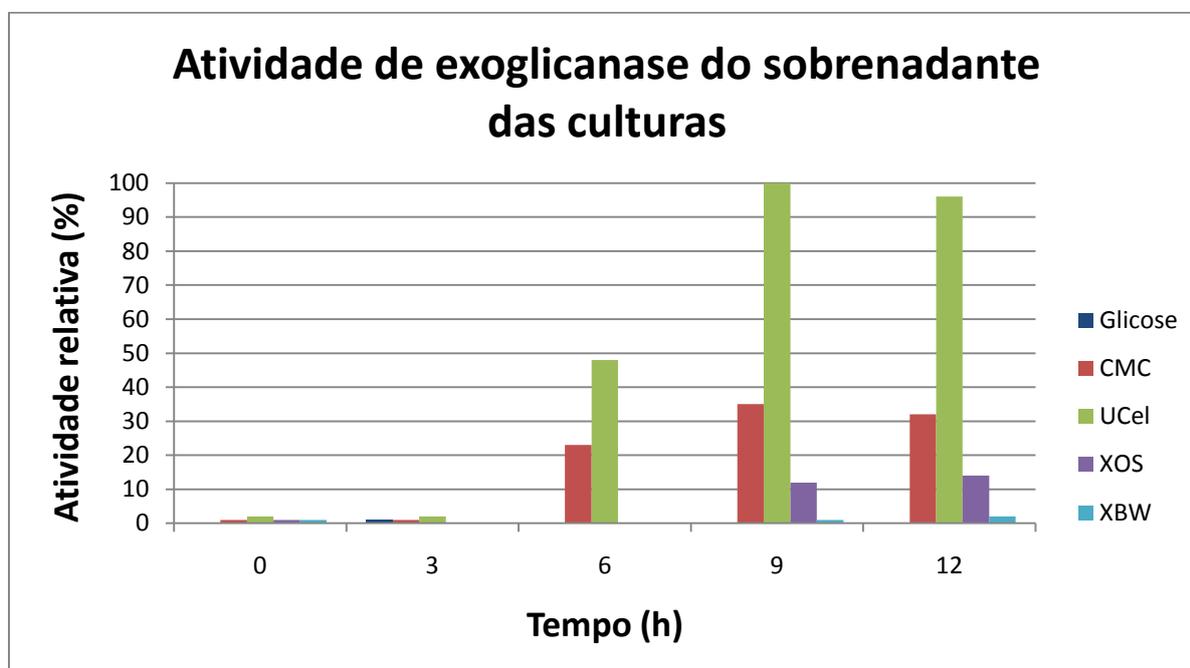
### **3.2 Ensaio enzimáticos com os sobrenadantes das culturas de *Bacillus sp* FT9**

Para determinar o perfil de atividade enzimática de cada cultura, amostras do sobrenadante das fermentações foram coletadas a cada 3h e ensaios enzimáticos foram realizados para analisar a sua atividade contra CMC (CMCase, na figura 21), UCel (exoglicanase, na figura 22), XOS (xilanase, na figura 23) e XBW (xilanase, na figura 24). Todos os ensaios foram realizados a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  em pH 7,0 por 30 minutos, e a atividade dosada pelo método sacarificante com DNS.

## RESULTADOS

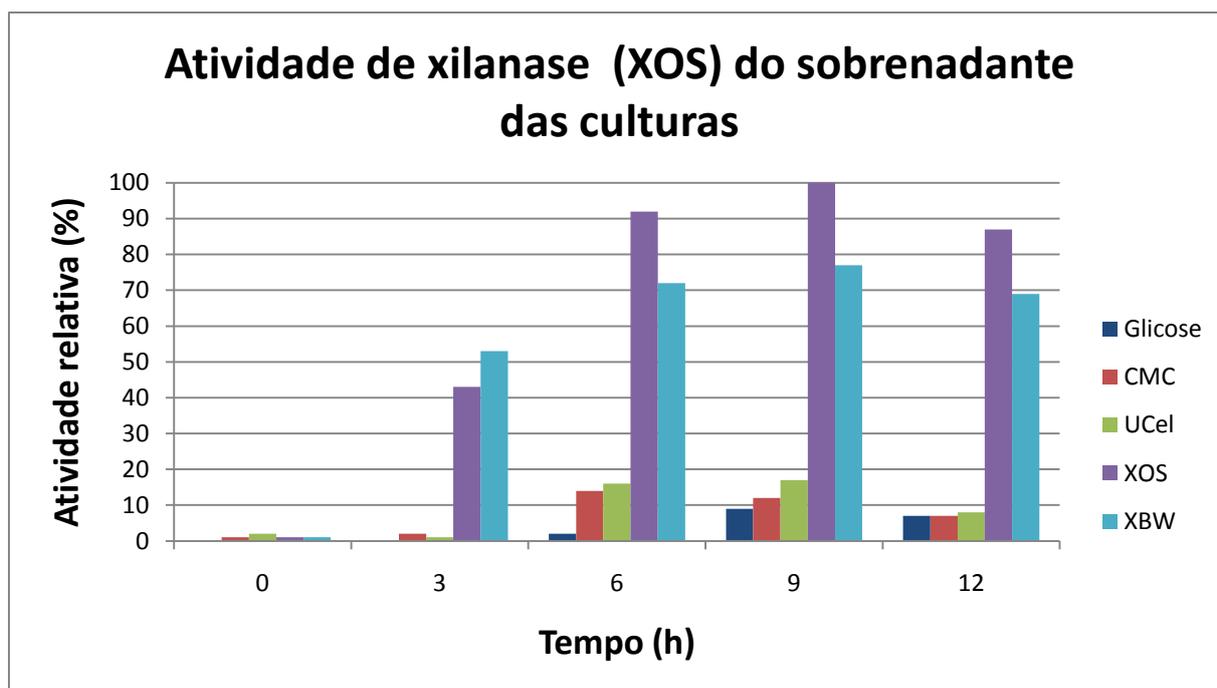


**Figura 21:** Atividade relativa de CMCase (testada contra CMC) do sobrenadante das culturas do *Bacillus sp.* FT9 crescidas no diferentes indutores, glicose, CMC, UCel, XOS e XBW (como indicado na legenda à direita), coletado nos tempos indicados. O sobrenadante da cultura em CMC após 9h de indução obteve a maior atividade absoluta (igual a 0,189 UI/mL) e foi estabelecida como 100%.

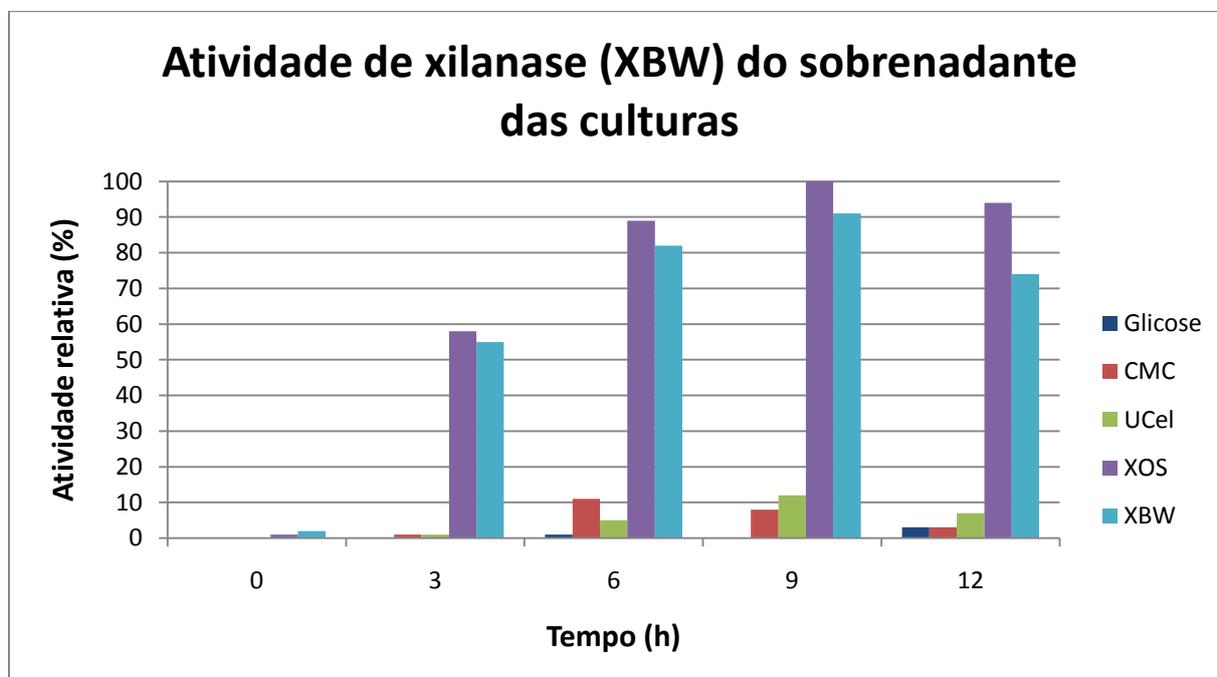


**Figura 22:** Atividade relativa de exoglicanase (testada contra UCel) do sobrenadante das culturas de *Bacillus sp.* FT9 crescidas nos diferentes indutores glicose, CMC, UCel, XOS e XBW (como indicado na legenda à direita), coletado nos tempos indicados. O sobrenadante da cultura em UCel após 9h de incubação obteve a maior atividade absoluta (igual a 0,029 UI/mL) e foi estabelecida como 100%.

## RESULTADOS



**Figura 23.** Atividade relativa de xilanase (testada contra XOS) do sobrenadante das culturas de *Bacillus sp.* FT9 crescidas nos diferentes indutores, glicose, CMC, UCel, XOS e XBW (como indicado na legenda à direita), coletado nos tempos indicados. O sobrenadante da cultura em XOS após 9h de incubação obteve a maior atividade absoluta (igual a 0,484 UI/mL) e foi estabelecida como o 100%.



**Figura 24:** Atividade relativa de xilanase (testada contra XBW) do sobrenadante das culturas de *Bacillus sp.* FT9 crescidas nos diferentes indutores glicose, CMC, UCel, XOS e XBW (como indicado na legenda à direita), coletado nos tempos indicados. O sobrenadante da cultura em XOS após 9h de incubação obteve a maior atividade absoluta (igual a 0,499 UI/mL) e foi estabelecida como o 100%.

## RESULTADOS

---

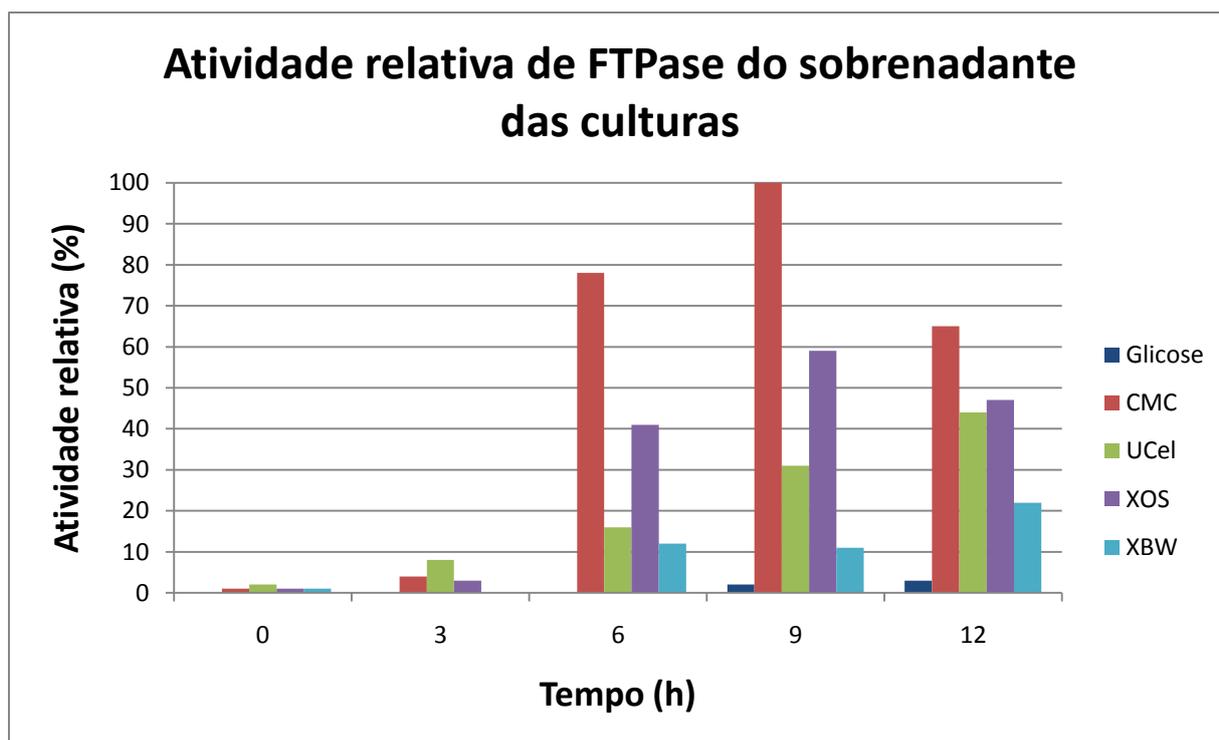
O sobrenadante da cultura de *Bacillus sp.* FT9 crescida em CMC por 9h apresentou a maior atividade de CMCase registrada, igual a 0,189 UI/mL, no qual também foi detectada uma atividade de exoglicanase igual a 0,010 UI/mL, cerca de 34% da atividade de exoglicanase encontrada no sobrenadante da cultura crescida em UCel por 9h (Figuras 21 e 22).

Nos sobrenadantes das culturas crescidas em XOS e XBW por 9h foi detectada atividade de CMCase igual a 0,136 e 0,045 UI/mL respectivamente (cerca de 72% e 24% da atividade relativa máxima de CMCase). Também foi observada nestes sobrenadantes atividade contra XOS igual a 0,484 e 0,373 UI/mL, e contra XBW igual a 0,499 e 0,454 UI/mL respectivamente (Figuras 21, 23 e 24).

A cultura que continha glicose não apresentou atividade significava contra nenhum substrato testado.

Para avaliar a atividade celulolítica total no sobrenadante das culturas de *Bacillus sp.* FT9, cultivadas com diferentes fontes de carbono, foi realizado um ensaio enzimático utilizando como substrato papel de filtro, a 50 °C, em pH 7,0 por 30 minutos (Figura 25).

## RESULTADOS



**Figura 25:** Atividade relativa de FTPase do sobrenadante das culturas de *Bacillus sp.* FT9 crescidas nos diferentes indutores, glicose, CMC, UCel, XOS e XBW (como indicado na legenda à direita), coletado nos tempos indicados. O sobrenadante da cultura em CMC após 9h de incubação obteve a maior atividade absoluta (igual a 0,093 UI/mL) e foi estabelecida como 100%.

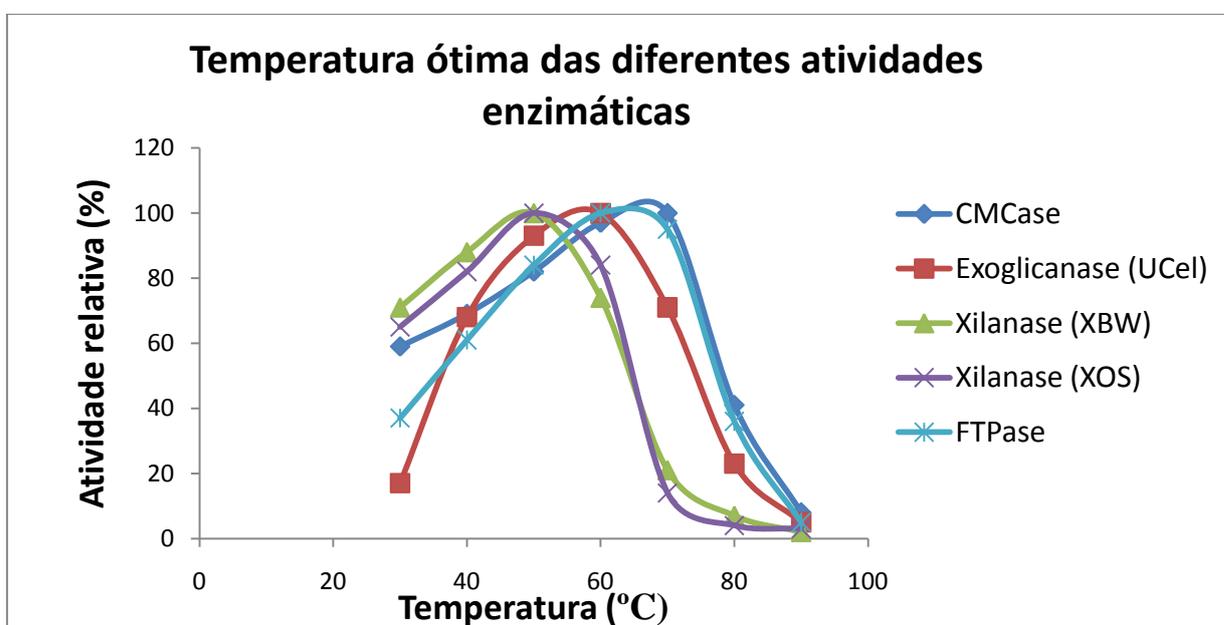
Em papel de filtro (FTP), o sobrenadante da cultura em CMC após 9h de incubação apresentou a maior atividade absoluta, igual a 0,093 UI/mL, e foi determinado como a atividade relativa de 100% para este ensaio. Uma baixa atividade (inferior a 10%) pode ser detectada no sobrenadante das culturas de 3h em CMC, UCel e XOS. Os sobrenadante das culturas de 12h em XBW e UCel apresentaram atividade contra papel de filtro igual a 0,020 e 0,041 UI/mL, respectivamente. E o sobrenadante da cultura de 9h em XOS apresentou atividade de FTPase igual a 0,055 UI/mL. A cultura em glicose não apresentou atividade enzimática significativa contra este substrato (Figura 25).

## RESULTADOS

### 3.3. Determinação de temperatura e pH ótimos de atividade e estabilidade térmica das enzimas.

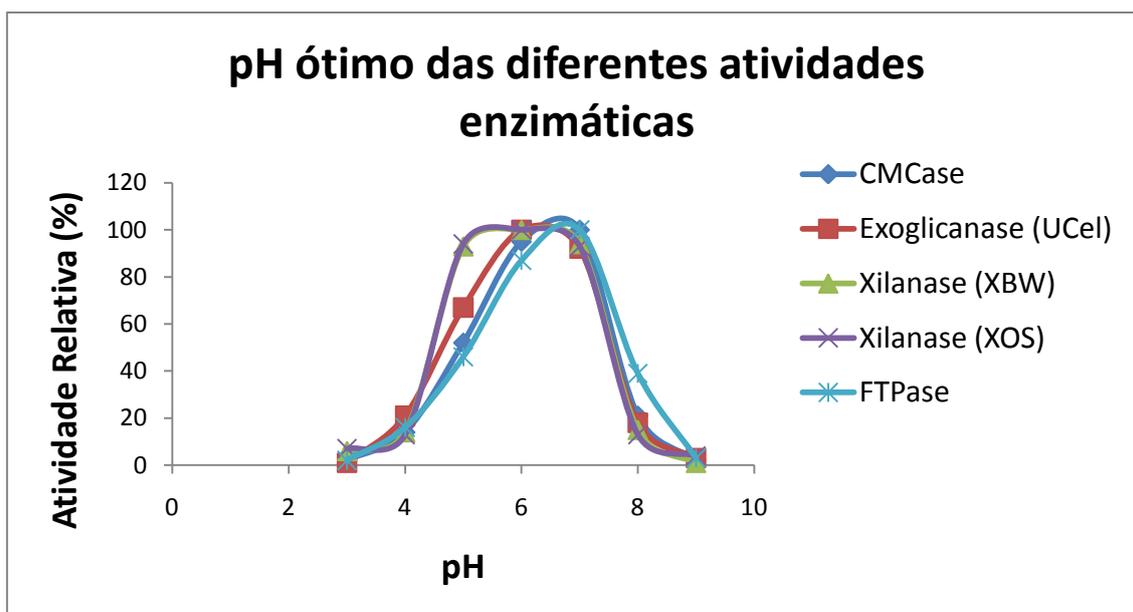
A melhor condição para induzir a produção de endoglicanases e exoglicanases foi obtida no sobrenadante das culturas de 9h de fermentação com CMC e UCel, respectivamente (Figuras 21-22). A melhor atividade enzimática para os dois tipos de xilanas foi obtida no sobrenadante da cultura crescida por 9h em XOS (Figuras 23-24). E a melhor condição para produzir celulases totais (FTPase) foi encontrada no sobrenadante da cultura de 9h de fermentação em CMC (Figura 25).

Para caracterizar essas atividades quanto a temperatura ótima de atividade e pH ótimo de atividade, as amostras com a maior atividade para cada indutor foram utilizadas em um ensaio com os seus respectivos substratos em diferentes condições de temperatura (Figura 26) e pH (Figura 27). O ensaio em diferentes temperaturas foi realizado em pH 7,0, e o ensaio em diferentes pH foi realizado à temperatura de 50 °C.



**Figura 26:** A temperatura ótima da atividade enzimática contra os substratos CMC (endoglicanase), UCel (Exoglicanase), Papel de Filtro (FTPase), XOS e XBW (Xilanase) foi determinada utilizando os sobrenadantes das culturas de *Bacillus sp.* FT9 que possuíam a maior atividade em cada indutor. Para cada enzima, a maior atividade absoluta detectada (UI/mL) foi definida como 100%.

## RESULTADOS



**Figura 27:** O pH ótimo da atividade enzimática contra os substratos CMC (endoglicanase), UCel (Exoglicanase), Papel de Filtro (FTPase), XOS e XBW (Xilanase) foi determinado utilizando os sobrenadantes das culturas de *Bacillus sp.* FT9 que possuíam a maior atividade em cada indutor. Para cada enzima, a maior atividade absoluta detectada (UI/mL) foi definida como 100%.

Para a CMCase a temperatura ótima de atividade está entre 60°C e 70°C, e o pH ótimo entre 6,0 e 7,0. A exoglicanase possui uma faixa de temperatura ótima entre 50°C e 60°C, e o pH ótimo entre 6,0 e 7,0. A atividade celulolítica total (FTPase), possui temperatura ótima de atividade entre 60°C e 70°C e pH ótimo entre 6,0 e 7,0. Para a atividade xilanolítica, não foram encontradas diferenças significativas quanto a temperatura ótima e o pH ótimo entre o ensaio usando os indutores XOS e XBW, logo temperatura ótima de atividade está entre 45°C e 55°C, e o pH ótimo de atividade entre 5,0 e 7,0 (Figuras 26-27).

Nas condições ideais encontradas para cada enzima, foram realizados ensaios enzimáticos para determinar a sua atividade absoluta e atividade específica (Tabela 4).

## RESULTADOS

**Tabela 4:** Atividades absoluta e específica para as enzimas nos sobrenadantes das culturas de *Bacillus sp.* FT9.

<b>Substrato</b>	<b>Enzima</b>	<b>Atividade Absoluta</b>	<b>Quantidade de Proteína</b>	<b>Atividade Específica</b>
<b>CMC</b>	<b>CMCase</b>	<b>0,231 UI/mL</b>	<b>0,431 mg/mL</b>	<b>0,536 UI/mg</b>
<b>Ucel</b>	<b>Exoglicanase</b>	<b>0,034 UI/mL</b>	<b>0,237 mg/mL</b>	<b>0,143 UI/mg</b>
<b>FTP</b>	<b>FTPase</b>	<b>0,111 UI/mL</b>	<b>0,431 mg/mL</b>	<b>0,258 UI/mg</b>
<b>XOS</b>	<b>Xilanase</b>	<b>0,521 UI/mL</b>	<b>0,846 mg/mL</b>	<b>0,616 UI/mg</b>
<b>XBW</b>	<b>Xilanase</b>	<b>0,537 UI/mL</b>	<b>0,846 mg/mL</b>	<b>0,635 UI/mg</b>

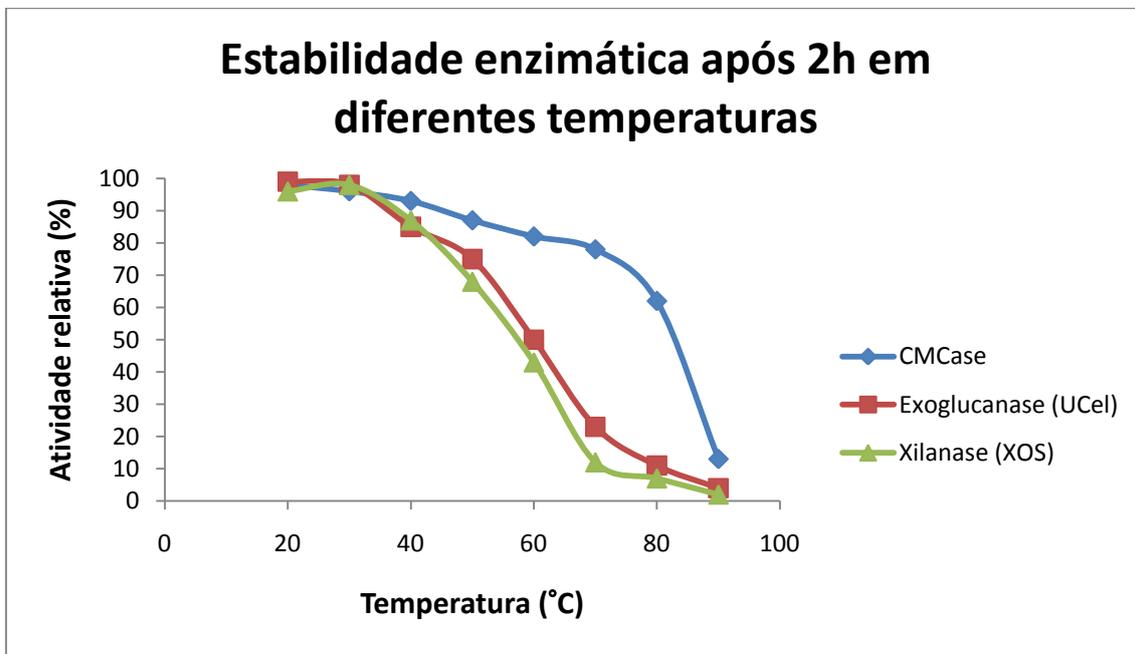
Os ensaios foram realizados na condição ideal encontrada para cada enzima.

O sobrenadante da cultura do *Bacillus sp.* FT9 com 9h de indução em CMC apresentou uma atividade absoluta e específica contra CMC de 0,231 UI/mL e 0,536 UI/mg, respectivamente. No mesmo sobrenadante foi detectada uma atividade absoluta e específica contra papel de filtro de 0,111 UI/mL e 0,258 UI/mg, respectivamente. O sobrenadante da cultura do *Bacillus sp.* FT9 com 9h de indução em Ucel apresentou uma atividade absoluta de 0,034 UI/mL e a atividade específica de 0,143 UI/mL contra Ucel. O sobrenadante da cultura do *Bacillus sp.* FT9 com 9h de indução em XOS apresentou uma atividade absoluta e específica contra XOS de 0,521 UI/mL e 0,616 UI/mg, respectivamente. E nesse mesmo sobrenadante foi detectada uma atividade absoluta e específica contra XBW de 0,537 UI/mL e 0,635 UI/mg, respectivamente (Tabela 4).

Para processos industriais, as enzimas que possuem atividade em altas temperaturas devem manter altas taxas de atividade mesmo após horas de incubação a temperaturas elevadas. Com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica das enzimas produzidas pela bactéria *Bacillus sp.* FT9, o sobrenadante das culturas com maior atividade em CMC, Ucel e XOS (Figura 21-23) foram incubados por 2h em

## RESULTADOS

temperaturas variando de 20°C a 90°C. Em seguida, a sua atividade nas condições ideais foi medida e comparada com a atividade de amostras não incubadas (Figura 28).



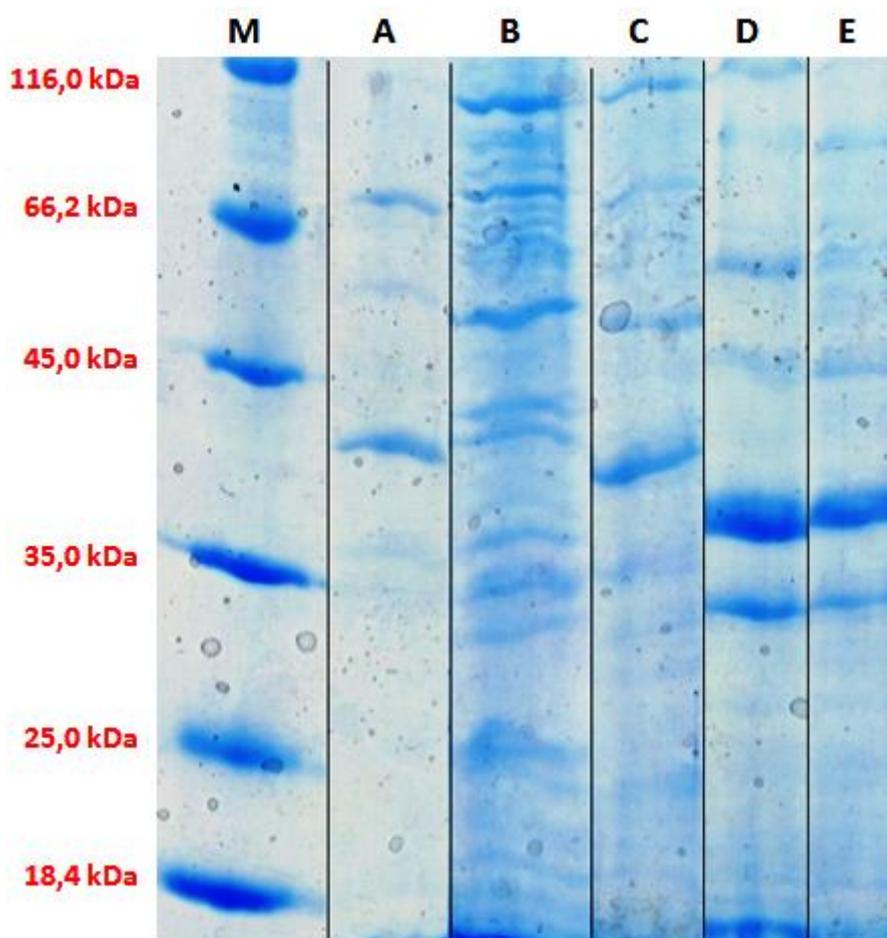
**Figura 28:** Atividade enzimática relativa do sobrenadante das culturas de *Bacillus sp.* FT9 com maior atividade contra CMC, UCel e XOS após a incubação por 2h nas temperaturas indicadas. O 100% foi definido como a atividade das mesmas amostras não incubadas.

As atividades de exoglucanase e xilanase mostraram-se estáveis até a temperatura de 50°C, em que mantiveram aproximadamente 70% da sua atividade original. A CMCase foi estável até a temperatura de 70 °C, em que aproximadamente 80% da sua atividade original foi conservada (Figura 28).

## RESULTADOS

### 3.4. Caracterização do perfil de secreção do *Bacillus sp.* FT9 em diferentes substratos

Concluindo a caracterização enzimática do *Bacillus sp.* FT9, os sobrenadantes das culturas, após 9h de indução, em meio M9S com glicose, CMC, UCel, XOS e XBW foram analisados em gel de poliacrilamida 12% e o perfil de secreção dessa bactéria analisado para cada substrato (Figura 29).



**Figura 29:** Análise eletroforética do sobrenadante da cultura de *Bacillus sp.* FT9 com 9h de crescimento em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) corado com *Comassie Blue Coloidal*. Em **M**, o marcador de peso molecular *Unstained Protein Marker* da Fermentas, com o tamanho de suas bandas indicados à esquerda. Em **A**, o sobrenadante da cultura em glicose. Em **B**, o sobrenadante da cultura em CMC. Em **C**, o sobrenadante da cultura em UCel. Em **D**, o sobrenadante da cultura em XOS. E em **E**, o sobrenadante da cultura em XBW.

## RESULTADOS

---

Nos sobrenadantes das culturas do *Bacillus sp.* FT9 crescidas em CMC e UCel existem proteínas de diversos tamanhos e com diferentes níveis de expressão. Os sobrenadantes das culturas com XOS e XBW apresentaram uma proteína em grande quantidade com aproximadamente 36 kDa. E o sobrenadante da cultura com glicose apresentou proteínas com dois diferentes pesos moleculares, aproximadamente 40 kDa e 67 kDa, mas ambas em pequenas quantidades (Figura 29).

Quando comparada com a quantidade de proteínas presentes nos sobrenadantes de cultura (Figura 20), essa análise eletroforética comprova a relação entre a secreção de proteínas do *Bacillus sp.* FT9 quando cultivado em meio com celulose, com xilana ou com glicose.

*Discussão*

## 1. Biodiversidade das fontes termais

As fontes termais analisadas nesse estudo encontravam-se em condições preservadas no momento da coleta, mas cerca de dois anos depois, houve modificações nas regiões próximas e no interior das fontes, com a instalação de estruturas de concreto em suas bordas e de sistemas hidráulicos para a utilização das águas termais em outros locais. Com essas modificações é possível que a microbiota local tenha sido alterada.

O ambiente aquático dulcícola geralmente é considerado um ambiente com pouca diversidade microbiana quando comparado com ambientes terrestres (Martiny *et al.*, 2006). Este fato também foi observado na água das fontes termais de Caldas Novas, em que 8 mL de água apresentaram 77 colônias de bactérias cultiváveis e apenas 13 diferentes tipos de morfologias. Um dos fatores contribuintes para a pequena quantidade de bactérias cultiváveis é o meio de cultura utilizado, que pode ter favorecido a competição para as bactérias que apresentam uma taxa de crescimento mais acelerada nas condições propostas. Em muitos trabalhos, diferentes técnicas de cultivo têm sido adotadas, com variações na composição dos meios de cultura (Sattley and Madigan, 2006) e até a utilização de outras espécies em culturas conjuntas (Carvalho *et al.*, 2008). Para microrganismos aquáticos, a utilização da água de onde foram isolados como um constituinte do meio de cultura tem possibilitado o cultivo de colônias até então não cultiváveis (Stingl *et al.*, 2008).

A presença de matéria orgânica vegetal no interior das fontes termais indicava a possibilidade de seus microrganismos apresentarem atividade enzimática contra substratos celulósicos. Essa hipótese foi comprovada com os ensaios enzimáticos em placa, em que todas as bactérias selecionadas cresceram em CMC e XOS (Figura 5). É interessante o *Bacillus sp.* FT9 crescer em celulose ultracristalina, pois apenas fungos e

## DISCUSSÃO

---

algumas bactérias anaeróbias que possuem celulosomas, como o *Clostridium thermocellum* e o *C. cellulolyticum*, conseguem crescer nesse substrato (Lynd *et al.*, 2002). Nem mesmo arqueas marinhas hipertermófilas (crescem a 100 °C) dos gêneros *Pyrococcus*, *Thermococcus* e *Thermotoga* conseguem utilizar UCel como um substrato de crescimento. Dentro do gênero *Bacillus*, atividades celulolíticas são descritas (Bischoff *et al.*, 2006, Ito 1997, Lee *et al.*, 2008), mas crescimento em UCel só foi relatado para uma bactéria do grupo do *B. cereus* isolada em uma mina de ouro (Rastogi *et al.*, 2009).

Outra característica que chamou a atenção para o *Bacillus sp.* FT9 foi a faixa de temperatura em que apresentou crescimento. Apesar da sua temperatura ótima de crescimento estar em torno de 48 °C, ela apresentou desenvolvimento a 60 °C, enquadrando-a como uma bactéria mesofílica termo tolerante (Blumer-Schuetz *et al.*, 2008). Dentro do gênero *Bacillus*, são descritas diversas bactérias termofílicas (Asoodeh *et al.*, 2010, Sunna *et al.*, 1997), mas o grupo do *B. cereus* é classicamente considerado um grupo mesofílico (Vilas-Boas *et al.*, 2007), embora haja linhagens isoladas com crescimento à temperatura de 60 °C (Rastogi *et al.*, 2009).

Analisando todos os fatores citados, o *Bacillus sp.* FT9 foi considerada a bactéria isolada mais interessante do ponto de vista biotecnológico, sendo selecionada para a identificação e caracterização enzimática.

## 2. Classificação e filogenética molecular

A característica mais marcante do gênero *Bacillus* é a presença de endósporos, embora tal estrutura também seja encontrada em outros gêneros de bactérias (Doroshenko *et al.*, 2005, Head *et al.*, 2008, Martirosian, 2009). A forma de bacilo Gram positivo, com as extremidades arredondadas e a presença de endósporos que não distorcem o esporângio foram características encontradas na estirpe FT9 (Bergey *et al.*, 1984), mas a confirmação só foi possível após as análises filogenéticas do *locus* da subunidade 16S do RNA ribossomal.

Um dos problemas relatados na literatura quanto ao aumento acelerado da quantidade de sequências do rDNA 16S em banco de dados públicos é a confiabilidade dos dados (Porwal *et al.*, 2009, Woo *et al.*, 2008), o que tem motivado a criação de bancos de dados privados em que as sequências depositadas são previamente analisadas e selecionadas, como o *Ribossomal Database Project*. Este banco de dados é especializado em sequências de rDNA 16S de bactérias, e disponibiliza ferramentas próprias para identificação e análises filogenéticas de organismos não identificados (Cole *et al.*, 2005, Cole *et al.*, 2007, Cole *et al.*, 2009).

A diferenciação entre espécies é particularmente difícil para o gênero *Bacillus* utilizando apenas a análise do rDNA 16S (Christensen *et al.*, 2005, Drancourt *et al.*, 2000, Rudi *et al.*, 2007), mas é possível estimar a relação entre bactérias desconhecidas e os principais grupos do gênero, como *B. cereus* ou *B. subtilis* (Porwal *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2010). Sendo ainda relatada uma relação direta entre nucleotídeos presentes no *locus* do rDNA 16S e a tolerância a baixas temperaturas de alguns integrantes do grupo do *B. cereus* (Pruss *et al.*, 1999).

## DISCUSSÃO

---

Geneticamente, as três espécies constituintes do grupo do *B. cereus* apresentam poucas diferenças, sendo proposta na literatura a inclusão das espécies *B. anthracis* e *B. thuringiensis* como variações do *B. cereus* (Helgason *et al.*, 2000). Apesar disso, marcadores genéticos, como o rDNA 23S, a região espaçadora do rDNA 16S-23S e o gene da subunidade  $\beta$  da DNA girase, são propostos para essa diferenciação, embora a sua abrangência não se aplique a todos os isolados descritos (Ash and Collins, 1992, Bavykin *et al.*, 2004). Outro marcador genético utilizado para a identificação da espécie no gênero *Bacillus* é o gene da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (Adekambi *et al.*, 2009, Blackwood *et al.*, 2004), que possui regiões variáveis bem definidas em cada espécie, inclusive para o *B. anthracis* e para algumas linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Ki *et al.*, 2009, Qi *et al.*, 2001), embora haja muitas críticas à abrangência dessa técnica e à possibilidade de falsos positivos.

As análises filogenéticas desse grupo de organismos não elucidam completamente as diferenças genéticas das três espécies, sendo recomendada a utilização de diferentes algoritmos para a comparação entre as sequências (Blackwood *et al.*, 2004). Mesmo com a análise combinada dos algoritmos de máxima parcimônia, evolução mínima e *NeighborJoin* para a sequência da RNA polimerase do *Bacillus sp.* FT9, não foi possível a diferenciação entre as espécies *B. cereus* e *B. thuringiensis*, pois na região sequenciada com qualidade havia polimorfismo somente para as linhagens de *B. anthracis*.

Outras abordagens com ferramentas moleculares são sugeridas na literatura para a identificação de *B. cereus*, como análises de polimorfismo em fragmentos de tamanho restrito (RFLP) (Lopez and Alippi, 2007), PCR de elementos repetitivos (Abriouel *et al.*, 2007) ou a utilização de kits diagnósticos de uso comercial (Halket *et al.*, 2010).

## DISCUSSÃO

---

Uma melhor caracterização fisiológica e bioquímica deve ser realizada com o *Bacillus sp.* FT9, analisando fatores como movimentação, resistência a antibióticos, atividades de catalase e oxidase, presença de plasmídeos como o pOX, característico de linhagens patogênicas do *B. anthracis*, mas encontrado em algumas linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Hu *et al.*, 2009), além de ensaios específicos (bioquímicos ou imunológicos) para proteínas que caracterizem as linhagens de *B. cereus*, como as enterotoxinas, ou as linhagens de *B. thuringiensis*, como as proteínas cristais (Vilas-Boas *et al.*, 2007). O experimento realizado para a detecção de proteínas cristais não é o mais apropriado, e apenas possui significância para resultados positivos. A utilização de microscopia com contraste de fase, corantes específicos para proteína cristal e um meio de cultura que induza a produção dessas proteínas seria mais adequado para a sua detecção, ou constatação de sua ausência (Vos, 2009).

Fatores ecológicos têm sido reportados como fundamentais para a classificação dentro do grupo do *B. cereus*, já que uma das principais diferenças entre as três espécies é o tipo de interação ecológica que realizam (Vilas-Boas *et al.*, 2007). Essa abordagem é inviável para o *Bacillus sp.* FT9, pois o local de seu isolamento não fornece qualquer informação quanto ao tipo de interação ecológica realizada com animais, e qualquer dado não registrado no momento da coleta, pode ter sido alterado pelas recentes modificações no local.

Na seleção inicial, 11 colônias com características morfológicas semelhantes ao *Bacillus sp.* FT9 foram isoladas (como, por exemplo, colônias arredondadas com as extremidades irregulares e cor branca fosca) e apenas uma foi utilizada no presente estudo. As demais colônias podem ser utilizadas em estudos futuros para a definição de uma nova linhagem ou subespécie, com o auxílio de ferramentas moleculares,

## DISCUSSÃO

---

bioquímicas e fisiológicas. As condições de crescimento em diferentes substratos e as atividades enzimáticas também podem ser utilizadas como parâmetros em tal caracterização.

### 3. Caracterização enzimática

O meio de cultura utilizado para a indução de enzimas específicas é fundamental para a eficiência da fermentação. A relação entre a concentração da fonte de carbono e da fonte de nitrogênio pode alterar drasticamente o crescimento do organismo e a produção de proteínas, há relatos de aumentos de até 14 vezes na atividade enzimática do sobrenadante de culturas de *B. subtilis* quando cultivado em meios otimizados (Avdiuk and Varbanets, 2008). Como não há referências de meios de cultura indutivos para celulasas ou xilanases de *B. cereus* ou *B. thuringiensis*, um meio padrão para bactérias foi utilizado nas culturas indutivas do *Bacillus sp.* FT9, otimizando-se apenas a concentração da fonte de nitrogênio orgânica adicionada. Quando uma quantidade muito elevada de extrato de levedura foi adicionado ao meio de cultura, não houve variações no crescimento do *Bacillus sp.* FT9, mas a atividade específica de CMCase no sobrenadante foi reduzida consideravelmente quando comparada com a cultura com menos nitrogênio orgânico, sendo possível que a produção das enzimas tenha sido inibida pela fonte de nitrogênio (Chen X. G. *et al.*, 2009, Kumar *et al.*, 2008) e que

## DISCUSSÃO

---

tenha ocorrido um aumento na quantidade de proteínas no sobrenadante não relacionadas com a hidrólise de CMC.

Com o meio de cultura melhorado, foi possível cultivar de maneira comparativa o *Bacillus sp.* FT9 em cinco fontes diferentes de carbono e analisar a sua fisiologia de crescimento. Os valores dos rendimentos são significativos para a comparação entre as diferentes culturas do *Bacillus sp.* FT9, mas para estimativas de aplicações industriais seria necessário o cálculo utilizando a biomassa celular, inviabilizado neste trabalho pela insolubilidade de alguns substratos e a falta de procedimentos para separar as células dos substratos.

Como esperado, a maior taxa de crescimento específico foi encontrada para a cultura induzida em glicose, pois este é um substrato simples que não exige hidrólise para a absorção pelas células. Nessa cultura, a quantidade de proteínas no sobrenadante é basal e a atividade contra celulose ou xilana é praticamente nula, já que a glicose é o principal repressor da expressão de enzimas relacionadas com a utilização de outras fontes de carbono (Andric *et al.*, 2010a, b).

Entre os substratos complexos, o *Bacillus sp.* FT9 apresentou as maiores taxas de crescimento e de rendimentos para a cultura induzida por XOS. Não há registros de taxas de crescimento específico tão elevadas para linhagens selvagens de *Bacillus* crescidas em XOS, embora sejam relatadas atividades de xilanase no sobrenadante das culturas superiores a 3000 UI/mL (Nagar *et al.*, 2010). A eficiência indutiva da XOS foi superior à XBW em todos os aspectos avaliados. Comparando o perfil protéico de secreção em ambas as induções, evidencia-se o mesmo tipo de xilanases sendo expressas, alterando-se apenas a quantidade. É possível que a natureza insolúvel da XOS exija uma maior concentração enzimática para a sua degradação eficiente do que a

## DISCUSSÃO

---

XBW, que é totalmente solúvel a 0,5% (p/v) (Asha Poorna and Prema, 2007). Aumentos consideráveis nas atividades xilanolíticas, em diferentes espécies de *Bacillus*, têm sido registrados com o melhoramento das condições de cultivo e com combinações de diferentes tipos de xilanas e outros carboidratos (Bocchini *et al.*, 2008, Yuan *et al.*, 2008).

As propriedades físico-químicas encontradas para a xilanase do *Bacillus sp.* FT9 são condizentes com as xilanases caracterizadas na literatura para linhagens de *B. subtilis* (Belien *et al.*, 2009, Yoon, 2009) e outras linhagens de *Bacillus* (Yin *et al.*, 2010), com temperatura ótima em torno de 50,0 °C, pH pouco ácido (entre 5,0 e 7,0) e uma massa molecular provável entre 30 kDa e 40 kDa. Essas características são de interesse para a indústria de conversão de biomassa, em que os processos ocorrem em pH ácido (Harris and Debolt 2010, Kumar *et al.*, 2008). Para a indústria de papel, xilanases de *B. pumillus*, sem atividade de celulases têm sido descritas, devido a sua propriedade alcalinofílica (Asha Poorna and Prema, 2007). No grupo do *Bacillus cereus* não há registro de nenhuma xilanase descrita.

No sobrenadante das culturas induzidas em CMC, as taxas de crescimento específico e rendimentos foram superiores às encontradas em UCel. Esse comportamento é bem descrito na literatura e se aplica a todos os organismos celulolíticos caracterizados, pois reflete a menor atividade enzimática contra substratos cristalinos do que contra substratos amorfos (Lynd *et al.*, 2002). Atividades de CMCCase são descritas para várias linhagens de *Bacillus*, com atividades absolutas variando entre 1,0 UI/mL a 60 UI/ mL no sobrenadante de cultura (Afzal *et al.*, 2010, Saleem *et al.*, 2008, Yang D. *et al.*, 2010). Para o grupo do *Bacillus cereus* são descritos apenas três isolados com atividade de CMCCase, variando de 0,02 UI/mL a 25 UI/mL (Lu *et al.*,

## DISCUSSÃO

---

2005, Thayer, 1978) e em apenas um deles houve atividade de exoglicanase, de 0,022 UI/mL (cerca de 65% da atividade de exoglucanase encontrada no *Bacillus sp.* FT9) sendo este o único registro dessa atividade para gênero *Bacillus* até a presente data (Rastogi *et al.*, 2009).

A atividade FTPase encontrada no sobrenadante do *Bacillus sp.* FT9 induzido em CMC representa a real capacidade celulolítica dessa bactéria, pois o papel de filtro simula substratos complexos utilizados industrialmente, sendo composto por regiões amorfas e regiões cristalinas (Eveleigh *et al.*, 2009). Os valores encontrados para as atividades absoluta e específica de FTPase são relativamente baixos quando comparados com os valores descritos na literatura para linhagens de bactérias selvagens com celulasas extracelulares, que atingem até 36 UI/mL (Zhang *et al.*, 2010).

As características físico-químicas das celulasas do *Bacillus sp.* FT9 é condizente com as endoglicanases descritas para linhagens termo tolerantes do gênero *Bacillus* (Saleem *et al.*, 2008, Yang D. *et al.*, 2010) e com as exoglicanases caracterizadas para bactérias que não apresentam celulosomas (Zhang *et al.*, 2010), embora o pH de atividade ótima e a termo resistência não sejam os mais procurados pelas indústrias de conversão de biomassa (Kumar *et al.*, 2008).

O perfil de secreção das culturas induzidas com celulose revela uma grande variedade de proteínas sendo expressas. Considerando a baixa atividade de exoglicanase no sobrenadante da cultura induzida em CMC, é provável que o sistema celulolítico do *Bacillus sp.* FT9 seja composto por várias enzimas independentes que atuem de maneira sinérgica em substratos celulósicos. Tal modelo é descrito para algumas linhagens dos gêneros *Clostridium* (Zhang *et al.*, 2010), *Cellulomonas* (Meinke *et al.*, 1994, Shen *et al.*, 1995), *Thermobifida* (Irwin *et al.*, 2000) e *Paenibacillus* (Sanchez *et al.*, 2004),

## DISCUSSÃO

---

sendo muito similar ao modelo descrito para fungos. Uma proposta semelhante é descrita para o gênero *Bacillus* (Afzal *et al.*, 2010, Ayyachamy and Vatsala 2007, Chen H. *et al.*, 2008), exceto pela atividade de exoglicanase que não era caracterizada nesse grupo.

A atividade CMCase presente no sobrenadante das culturas de *Bacillus sp.* FT9 induzidas em xilana revela a interdependência entre esses substratos e pode ser interessante para as indústrias de conversão de biomassa na degradação de substratos complexos como a lignocelulose (Kumar *et al.*, 2008, Mosier *et al.*, 2005), embora na indústria do papel, atividades enzimáticas independentes sejam mais vantajosas (Asha Poorna and Prema, 2007, Ayyachamy and Vatsala, 2007).

Pela descrição realizada neste trabalho, o *Bacillus sp.* FT9 apresentou características interessantes para indústrias de conversão de biomassa, mas ainda são necessários muitos estudos para uma melhor descrição do organismo e dos seus produtos enzimáticos. A caracterização da quantidade de atividades presentes no sobrenadante das diferentes induções é fundamental para a definição da melhor estratégia para a purificação das enzimas. Somente com as enzimas purificadas é possível estimar o seu potencial biotecnológico, sendo possível inclusive a clonagem e expressão heteróloga em organismos já utilizados em processos industriais.

## 4. Perspectivas

Inicialmente, a identificação da espécie do *Bacillus sp.* FT9 é necessária, utilizando técnicas moleculares e bioquímicas para diferenciação entre *B. cereus* e *B. thuringiensis*. Subsequente à identificação, uma melhor caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica, incluindo o seqüenciamento do rDNA 16S completo, deve ser realizada incluindo as colônias isoladas da fonte termal II com morfologia semelhante ao *Bacillus sp.* FT9, caracterizando assim a linhagem à qual este pertence.

Do ponto de vista enzimático, ensaios buscando o melhoramento do meio de cultura e das condições de cultivo devem ser realizados, buscando um aumento na eficiência de produção enzimática e facilitando as caracterizações futuras. As enzimas devem ser analisadas quanto ao número de atividades presentes em cada sobrenadante com ensaios de zimograma. E a purificação das enzimas deverá ser realizada para a definição de características cinético-químicas, como  $K_m$  e  $K_{cat}$ . Só então o potencial para aplicação biotecnológica dessas enzimas poderá ser avaliado e as estratégias de utilização definidas, como a expressão heteróloga em sistemas mais conhecidos ou a utilização da própria bactéria em biorreatores.

*Referências*

*Bibliográficas*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abriouel H, Ben Omar N, Lucas Lopez R, Martinez Canamero M, Ortega E, Galvez A. 2007. Differentiation and characterization by molecular techniques of *Bacillus cereus* group isolates from poto poto and degue, two traditional cereal-based fermented foods of Burkina Faso and Republic of Congo. *J Food Prot* 70: 1165-1173.
- Adekambi T, Drancourt M, Raoult D. 2009. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol* 17: 37-45.
- Adiguzel A, Ozkan H, Baris O, Inan K, Gulluce M, Sahin F. 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J Microbiol Methods* 79: 321-328.
- Afzal S, Saleem M, Yasmin R, Naz M, Imran M. 2010. Pre and post cloning characterization of a beta-1,4-endoglucanase from *Bacillus sp.* *Mol Biol Rep* 37: 1717-1723.
- Aizawa T, Urai M, Iwabuchi N, Nakajima M, Sunairi M. 2010. *Bacillus tryoxylicola sp. nov.*, xylanase-producing alkaliphilic bacteria isolated from the guts of Japanese horned beetle larvae (*Trypoxylus dichotomus septentrionalis*). *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 61-66.
- Andric P, Meyer AS, Jensen PA, Dam-Johansen K. 2010a. Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. *Appl Biochem Biotechnol* 160: 280-297.
- . 2010b. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnol Adv* 28: 308-324.
- Andronopoulou E, Vorgias CE. 2004. Multiple components and induction mechanism of the chitinolytic system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 694-702.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Armstrong Z, Reitinger S, Kantner T, Withers SG. 2010. Enzymatic thioxyloside synthesis: characterization of thioglycoligase variants identified from a site-saturation mutagenesis library of *Bacillus circulans* xylanase. *Chembiochem* 11: 533-538.
- Ash C, Collins MD. 1992. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 73: 75-80.
- Ash C, Farrow JA, Dorsch M, Stackebrandt E, Collins MD. 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* 41: 343-346.
- Asha Poorna C, Prema P. 2007. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresour Technol* 98: 485-490.
- Asoodeh A, Chamani J, Lagzian M. 2010. A novel thermostable, acidophilic alpha-amylase from a new thermophilic "*Bacillus sp. Ferdowsicous*" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. *Int J Biol Macromol* 46: 289-297.
- Aspinall GO. 1959. Structural chemistry of the hemicelluloses. *Adv Carbohydr Chem* 14: 429-468.
- Avdiuk KV, Varbanets LD. 2008. [Optimization of cultivation conditions of the alpha-amylase producer *Bacillus subtilis* 147]. *Mikrobiol Z* 70: 10-16.
- Ayyachamy M, Vatsala TM. 2007. Production and partial characterization of cellulase free xylanase by *Bacillus subtilis* C 01 using agriresidues and its application in biobleaching of nonwoody plant pulps. *Lett Appl Microbiol* 45: 467-472.
- Bais HP, Fall R, Vivanco JM. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 134: 307-319.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Bano S, Ul Qader SA, Aman A, Azhar A. 2009. Partial purification and some properties of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. *Indian J Biochem Biophys* 46: 401-404.
- Bao Y, Liu W, He Y, Dong Z. 2009. [Expression of alkali-tolerant xylanase in *Bacillus megaterium*]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 49: 1353-1359.
- Bavykin SG, Lysov YP, Zakhariev V, Kelly JJ, Jackman J, Stahl DA, Cherni A. 2004. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J Clin Microbiol* 42: 3711-3730.
- Bayer EA, Lamed R, Himmel ME. 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Curr Opin Biotechnol* 18: 237-245.
- Beguín P, Aubert JP. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev* 13: 25-58.
- Beguín P, Lemaire M. 1996. The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31: 201-236.
- Belancic A, Scarpa J, Peirano A, Diaz R, Steiner J, Eyzaguirre J. 1995. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. *J Biotechnol* 41: 71-79.
- Belien T, Joye IJ, Delcour JA, Courtin CM. 2009. Computational design-based molecular engineering of the glycosyl hydrolase family 11 *B. subtilis* XynA endoxylanase improves its acid stability. *Protein Eng Des Sel* 22: 587-596.
- Beloqui A, de Maria PD, Golyshin PN, Ferrer M. 2008. Recent trends in industrial microbiology. *Curr Opin Microbiol* 11: 240-248.
- Bergey DH, Krieg NR, Holt JG. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Beukes N, Pletschke BI. 2006. Effect of sulfur-containing compounds on *Bacillus* cellulosome-associated 'CMCase' and 'Avicelase' activities. *FEMS Microbiol Lett* 264: 226-231.
- Bischoff KM, Rooney AP, Li XL, Liu S, Hughes SR. 2006. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett* 28: 1761-1765.
- Blackwood KS, Turenne CY, Harmsen D, Kabani AM. 2004. Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus* species. *J Clin Microbiol* 42: 1626-1630.
- Blumer-Schuette SE, Kataeva I, Westpheling J, Adams MW, Kelly RM. 2008. Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects. *Curr Opin Biotechnol* 19: 210-217.
- Bocchini DA, Gomes E, Da Silva R. 2008. Xylanase production by *Bacillus circulans* D1 using maltose as carbon source. *Appl Biochem Biotechnol* 146: 29-37.
- Bolshakova EV, Ponomarev AA, Novikov AA, Svetlichnyi VA, Velikodvorskaya GA. 1994. Cloning and expression of genes coding for carbohydrate degrading enzymes of *Anaerocellum thermophilum* in *E.coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1076-1080.
- Boraston AB, Kwan E, Chiu P, Warren RA, Kilburn DG. 2003. Recognition and hydrolysis of noncrystalline cellulose. *J Biol Chem* 278: 6120-6127.
- Borriss R, Zemek J, Augustin J, Pacova Z, Kuniak L. 1980. [beta-1,3-1,4-Glucanase in sporeforming microorganisms. II. Production of beta-glucan-hydrolases by various *Bacillus* species (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol Naturwiss* 135: 435-442.
- Buchholz K, Seibel J. 2008. Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydr Res* 343: 1966-1979.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 573-606.
- Burton NP, Norris PR. 2000. Microbiology of acidic, geothermal springs of Montserrat: environmental rDNA analysis. *Extremophiles* 4: 315-320.
- Campos JEGT, U.; Haesbaert, F.F. 2005. Águas Quentes de Caldas Novas, GO - Notável ocorrência de águas termais sem associação com magmatismo. *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil*.
- Carvalho FR, Nastasi FR, Gamba RC, Foronda AS, Pellizari VH. 2008. Occurrence and diversity of Legionellaceae in polar lakes of the Antarctic peninsula. *Curr Microbiol* 57: 294-300.
- Cary SC, McDonald IR, Barrett JE, Cowan DA. 2010. On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nat Rev Microbiol* 8: 129-138.
- Chen H, Xu B, Liao JH, Guan XY, Wu Q. 2008. [Expression of endoglucanase gene in *Bacillus Megaterium* and characterization of recombinant enzyme]. *Yi Chuan* 30: 649-654.
- Chen XG, Yang X, Chen J, Zhang SH, Xiao BD. 2009. [Anaerobic biodegradation of microcystin by bacterial community from sediment of Dianchi Lake]. *Huan Jing Ke Xue* 30: 2527-2531.
- Choi NS, Kim BH, Park CS, Han YJ, Lee HW, Choi JH, Lee SG, Song JJ. 2009. Multiple-layer substrate zymography for detection of several enzymes in a single sodium dodecyl sulfate gel. *Anal Biochem* 386: 121-122.
- Christensen JJ, Andresen K, Justesen T, Kemp M. 2005. Ribosomal DNA sequencing: experiences from use in the Danish National Reference Laboratory for Identification of *Bacteria*. *APMIS* 113: 621-628.
- Cleemput G, Van Laere K, Hessing M, Van Leuven F, Torrekens S, Delcour JA. 1997. Identification and characterization of a novel arabinoxylanase from wheat flour. *Plant Physiol* 115: 1619-1627.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM, Garrity GM, Tiedje JM. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 33: D294-296.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM, Tiedje JM. 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* 35: D169-172.
- Cole JR, *et al.*, 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37: D141-145.
- Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 29: 3-23.
- Covert SF, Bolduc J, Cullen D. 1993. Genomic organization of a cellulase gene family in *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr Genet* 23: 374.
- Crawford RL. 2005. Microbial diversity and its relationship to planetary protection. *Appl Environ Microbiol* 71: 4163-4168.
- Das H, Singh SK. 2004. Useful byproducts from cellulosic wastes of agriculture and food industry--a critical appraisal. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44: 77-89.
- de Buron I, Morand S. 2004. Deep-sea hydrothermal vent parasites: why do we not find more? *Parasitology* 128: 1-6.
- Dick GJ, Tebo BM. 2010. Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Environ Microbiol*.
- Doroshenko EA, Zenova GM, Zviagintsev DG, Sudnitsyn, II. 2005. [Spore germination and mycelial growth of streptomycetes at different humidity levels]. *Mikrobiologiya* 74: 795-799.
- Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38: 3623-3630.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Earl AM, Losick R, Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends Microbiol 16: 269-275.
- Eveleigh DE, Mandels M, Andreotti R, Roche C. 2009. Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnol Biofuels 2: 21.
- Faith DP, Walker PA. 2002. The role of trade-offs in biodiversity conservation planning: linking local management, regional planning and global conservation efforts. J Biosci 27: 393-407.
- Farrow JA, Ash C, Wallbanks S, Collins MD. 1992. Phylogenetic analysis of the genera *Planococcus*, *Marinococcus* and *Sporosarcina* and their relationships to members of the genus *Bacillus*. FEMS Microbiol Lett 72: 167-172.
- Fritze D. 2004. Taxonomy of the genus *bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology 94: 1245-1248.
- Gallezot P. 2008. Catalytic conversion of biomass: challenges and issues. ChemSusChem 1: 734-737.
- Gibbs MD, Reeves RA, Mandelman D, Mi Q, Lee J, Bergquist PL. 2009. Molecular diversity and catalytic activity of *Thermus* DNA polymerases. Extremophiles 13: 817-826.
- Gilbert HJ. 2007. Cellulosomes: microbial nanomachines that display plasticity in quaternary structure. Mol Microbiol 63: 1568-1576.
- Gnansounou E. 2010. Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: Current situation and perspectives. Bioresour Technol.
- Gorska E, Tudek B, Russel S. 2001. Degradation of cellulose by nitrogen-fixing strain of *Bacillus polymyxa*. Acta Microbiol Pol 50: 129-137.
- Halket G, Dinsdale AE, Logan NA. 2010. Evaluation of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus species* and other aerobic endosporeformers. Lett Appl Microbiol 50: 120-126.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Pages 95-98. Nucl. Acids. Symp Ser.
- Hames BR. 2009. Biomass compositional analysis for energy applications. *Methods Mol Biol* 581: 145-167.
- Hamilton-Brehm SD, Mosher JJ, Vishnivetskaya T, Podar M, Carroll S, Allman S, Phelps TJ, Keller M, Elkins JG. 2010. *Caldicellulosiruptor obsidiansis* sp. nov., an anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from Obsidian Pool, Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* 76: 1014-1020.
- Han SJ, Yoo YJ, Kang HS. 1995. Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. The cell gene of *Bacillus* sp. D04 has exo- and endoglucanase activity. *J Biol Chem* 270: 26012-26019.
- Harris D, Debolt S. 2010. Synthesis, regulation and utilization of lignocellulosic biomass. *Plant Biotechnol J*.
- Harwood CR. 1989. *Bacillus*. New York: Plenum Press.
- Head DS, Cenkowski S, Holley R, Blank G. 2008. Effects of superheated steam on *Geobacillus stearothermophilus* spore viability. *J Appl Microbiol* 104: 1213-1220.
- Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolsto AB. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 66: 2627-2630.
- Hmidet N, Maalej H, Haddar A, Nasri M. 2010. A Novel alpha-Amylase from *Bacillus mojavensis* A21: Purification and Biochemical Characterization. *Appl Biochem Biotechnol*.
- HPA. 2007. Health Protection Agency. Identification of *Bacillus* species. National Standard Method BSOP 9.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Hu X, Van der Auwera G, Timmery S, Zhu L, Mahillon J. 2009. Distribution, diversity, and potential mobility of extrachromosomal elements related to the *Bacillus anthracis* pXO1 and pXO2 virulence plasmids. *Appl Environ Microbiol* 75: 3016-3028.
- Huang X, Madan A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9: 868-877.
- Hugh-Jones M, Blackburn J. 2009. The ecology of *Bacillus anthracis*. *Mol Aspects Med* 30: 356-367.
- Irwin DC, Zhang S, Wilson DB. 2000. Cloning, expression and characterization of a family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *Eur J Biochem* 267: 4988-4997.
- Ito S. 1997. Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: enzymatic properties, genetics, and application to detergents. *Extremophiles* 1: 61-66.
- Jeoh T, Wilson DB, Walker LP. 2006. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. *Biotechnol Prog* 22: 270-277.
- Kang HJ, Ishikawa K. 2007. Analysis of active center in hyperthermophilic cellulase from *Pyrococcus horikoshii*. *J Microbiol Biotechnol* 17: 1249-1253.
- Kataeva IA, *et al.*, 2009. Genome sequence of the anaerobic, thermophilic, and cellulolytic bacterium "*Anaerocellum thermophilum*" DSM 6725. *J Bacteriol* 191: 3760-3761.
- Ki JS, Zhang W, Qian PY. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. *J Microbiol Methods* 77: 48-57.
- Kim CH. 1995. Characterization and substrate specificity of an endo-beta-1,4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Appl Environ Microbiol* 61: 959-965.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Kim HW, Mino K, Ishikawa K. 2008. Crystallization and preliminary X-ray analysis of endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64: 1169-1171.
- Kruger NJ. 1994. The Bradford method for protein quantitation. Methods Mol Biol 32: 9-15.
- Kumar R, Singh S, Singh OV. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J Ind Microbiol Biotechnol 35: 377-391.
- Lagaert S, Belien T, Volckaert G. 2009. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. Semin Cell Dev Biol 20: 1064-1073.
- Lamanna C. 1940. The Taxonomy of the Genus *Bacillus*: I. Modes of Spore Germination. J Bacteriol 40: 347-361.
- Lee YJ, Kim BK, Lee BH, Jo KI, Lee NK, Chung CH, Lee YC, Lee JW. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresour Technol 99: 378-386.
- Li W, Zhang WW, Yang MM, Chen YL. 2008. Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. Mol Biotechnol 40: 195-201.
- Li W, Huan X, Zhou Y, Ma Q, Chen Y. 2009. Simultaneous cloning and expression of two cellulase genes from *Bacillus subtilis* newly isolated from Golden Takin (*Budorcas taxicolor Bedfordi*). Biochem Biophys Res Commun 383: 397-400.
- Lopez AC, Alippi AM. 2007. Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey. Int J Food Microbiol 117: 175-184.
- Lozupone CA, Knight R. 2007. Global patterns in bacterial diversity. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 11436-11440.
- Lu WJ, Wang HT, Yang SJ, Wang ZC, Nie YF. 2005. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. J Gen Appl Microbiol 51: 353-360.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Luo L, van der Voet E, Huppes G. 2010. Biorefining of lignocellulosic feedstock - Technical, economic and environmental considerations. *Bioresour Technol*.
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 506-577, table of contents.
- Lynd LR, *et al.*, 2008. How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol* 26: 169-172.
- Maki M, Leung KT, Qin W. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci* 5: 500-516.
- Margulies M, *et al.*, 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
- Martiny JB, *et al.*, 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Microbiol* 4: 102-112.
- Martirosian G. 2009. [*Clostridium spp.* spores in pathomechanism of autism]. *Wiad Lek* 62: 119-122.
- McHardy AC, Rigoutsos I. 2007. What's in the mix: phylogenetic classification of metagenome sequence samples. *Curr Opin Microbiol* 10: 499-503.
- Meinke A, Gilkes NR, Kwan E, Kilburn DG, Warren RA, Miller RC, Jr. 1994. Cellobiohydrolase A (CbhA) from the cellulolytic bacterium *Cellulomonas fimi* is a beta-1,4-exocellobiohydrolase analogous to *Trichoderma reesei* CBH II. *Mol Microbiol* 12: 413-422.
- Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 96: 673-686.
- Murray PR, Baron EJ. 2007a. *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: ASM Press.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- . 2007b. *Bacillus* and recently derived genera. In: Manual of clinical microbiology. Washington, D.C.: ASM Press.
- Nagar S, Gupta VK, Kumar D, Kumar L, Kuhad RC. 2010. Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. J Ind Microbiol Biotechnol 37: 71-83.
- Nunoura T, *et al.*, 2010. Archaeal diversity and distribution along thermal and geochemical gradients in hydrothermal sediments at the Yonaguni Knoll IV hydrothermal field in the Southern Okinawa trough. Appl Environ Microbiol 76: 1198-1211.
- Pace NR. 2009. Mapping the tree of life: progress and prospects. Microbiol Mol Biol Rev 73: 565-576.
- Pearce DA, Hughes KA, Lachlan-Cope T, Harangozo SA, Jones AE. 2010. Biodiversity of air-borne microorganisms at Halley station, Antarctica. Extremophiles 14: 145-159.
- Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clin Chem 55: 856-866.
- Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol 67: 577-591.
- Porwal S, Lal S, Cheema S, Kalia VC. 2009. Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. PLoS One 4: e4438.
- Pruss BM, Francis KP, von Stetten F, Scherer S. 1999. Correlation of 16S ribosomal DNA signature sequences with temperature-dependent growth rates of mesophilic and psychrotolerant strains of the *Bacillus cereus* group. J Bacteriol 181: 2624-2630.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Qi Y, Patra G, Liang X, Williams LE, Rose S, Redkar RJ, DelVecchio VG. 2001. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol* 67: 3720-3727.
- Rabinovich ML, Melnick MS, Bolobova AV. 2002. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Mosc)* 67: 850-871.
- Raghukumar C, Muraleedharan U, Gaud VR, Mishra R. 2004. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 433-441.
- Rajendhran J, Gunasekaran P. 2010. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res*.
- Rasmussen LE, Meyer AS. 2010. Size exclusion chromatography for the quantitative profiling of the enzyme-catalyzed hydrolysis of Xylo-oligosaccharides. *J Agric Food Chem* 58: 762-769.
- Rasmussen LE, Sorensen JF, Meyer AS. 2010. Kinetics and substrate selectivity of a *Triticum aestivum* xylanase inhibitor (TAXI) resistant D11F/R122D variant of *Bacillus subtilis* XynA xylanase. *J Biotechnol* 146: 207-214.
- Rastogi G, Muppidi GL, Gurram RN, Adhikari A, Bischoff KM, Hughes SR, Apel WA, Bang SS, Dixon DJ, Sani RK. 2009. Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 585-598.
- Reese ET, Siu RG, Levinson HS. 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bacteriol* 59: 485-497.
- Reitinger S, *et al.*, 2010. Circular permutation of *Bacillus circulans* xylanase: a kinetic and structural study. *Biochemistry* 49: 2464-2474.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Romero-Garcia S, Hernandez-Bustos C, Merino E, Gosset G, Martinez A. 2009. Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 8: 23.
- Rudi K, Zimonja M, Trosvik P, Naes T. 2007. Use of multivariate statistics for 16S rRNA gene analysis of microbial communities. *Int J Food Microbiol* 120: 95-99.
- Saha P, Krishnamurthi S, Bhattacharya A, Sharma R, Chakrabarti T. 2010. *Fontibacillus aquaticus* gen. nov., sp. nov., isolated from a warm spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 422-428.
- Saleem M, Akhtar MS, Yasmin R, Zahid M, Malik NN, Afzal M, Rajoka MI. 2008. Production, purification and characterization of beta-1,4-endoglucanase from a novel bacterial strain CTP-09 of a *Bacillus* sp. *Protein Pept Lett* 15: 402-410.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez MM, Irwin DC, Pastor FI, Wilson DB, Diaz P. 2004. Synergistic activity of *Paenibacillus* sp. BP-23 cellobiohydrolase Cel48C in association with the contiguous endoglucanase Cel9B and with endo- or exo-acting glucanases from *Thermobifida fusca*. *Biotechnol Bioeng* 87: 161-169.
- Santos F, Borém, A., Caldas C. 2009. *Cana-de-Açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool - Tecnologias e Perspectivas*.
- Sattley WM, Madigan MT. 2006. Isolation, characterization, and ecology of cold-active, chemolithotrophic, sulfur-oxidizing bacteria from perennially ice-covered Lake Fryxell, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* 72: 5562-5568.
- Schaeffer F, Matuschek M, Guglielmi G, Miras I, Alzari PM, Beguin P. 2002. Duplicated dockerin subdomains of *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelD bind to a cohesin domain of the scaffolding protein CipA with distinct thermodynamic parameters and a negative cooperativity. *Biochemistry* 41: 2106-2114.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Scheckenbach F, Hausmann K, Wylezich C, Weitere M, Arndt H. 2010. Large-scale patterns in biodiversity of microbial eukaryotes from the abyssal sea floor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 115-120.
- Sharrock KR. 1988. Cellulase assay methods: a review. *J Biochem Biophys Methods* 17: 81-105.
- Shaver YJ, Nagpal ML, Rudner R, Nakamura LK, Fox KF, Fox A. 2002. Restriction fragment length polymorphism of rRNA operons for discrimination and intergenic spacer sequences for cataloging of *Bacillus subtilis* sub-groups. *J Microbiol Methods* 50: 215-223.
- Shen H, Gilkes NR, Kilburn DG, Miller RC, Jr., Warren RA. 1995. Cellobiohydrolase B, a second exo-cellobiohydrolase from the cellulolytic bacterium *Cellulomonas fimi*. *Biochem J* 311 ( Pt 1): 67-74.
- Shoo LP. 2010. Planning for biodiversity in future climates. *Science* 327: 1452; author reply 1453.
- Silva VLMM, Gomes, W. C., Alsina, O. L. S. 2007. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 2, 1: 27-32.
- Simbahan J, Drijber R, Blum P. 2004. *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1703-1707.
- Song ZQ, Chen JQ, Jiang HC, Zhou EM, Tang SK, Zhi XY, Zhang LX, Zhang CL, Li WJ. 2010. Diversity of *Crenarchaeota* in terrestrial hot springs in Tengchong, China. *Extremophiles*.
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56: 845-857.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Stingl U, Cho JC, Foo W, Vergin KL, Lanoil B, Giovannoni SJ. 2008. Dilution-to-extinction culturing of psychrotolerant planktonic bacteria from permanently ice-covered lakes in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Microb Ecol* 55: 395-405.
- Stout LM, Blake RE, Greenwood JP, Martini AM, Rose EC. 2009. Microbial diversity of boron-rich volcanic hot springs of St. Lucia, Lesser Antilles. *FEMS Microbiol Ecol*.
- Stricker AR, Mach RL, de Graaff LH. 2008. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 211-220.
- Sunna A, Prowe SG, Stoffregen T, Antranikian G. 1997. Characterization of the xylanases from the new isolated thermophilic xylan-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain K-3d and *Bacillus flavothermus* strain LB3A. *FEMS Microbiol Lett* 148: 209-216.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Tamura Z, Nakajima T. 1967. [DNS method]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 12: 729-736.
- Teixeira LC, Peixoto RS, Cury JC, Sul WJ, Pellizari VH, Tiedje J, Rosado AS. 2010. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. *ISME J*.
- Terrasán CR, Temer B, Duarte MC, Carmona EC. 2010. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresour Technol* 101: 4139-4143.
- Thayer DW. 1978. Carboxymethylcellulase produced by facultative bacteria from the hind-gut of the termite *Reticulitermes hesperus*. *J Gen Microbiol* 106: 13-18.
- Trevors JT. 2010. One gram of soil: a microbial biochemical gene library. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97: 99-106.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Tuffin M, Anderson D, Heath C, Cowan DA. 2009. Metagenomic gene discovery: how far have we moved into novel sequence space? *Biotechnol J* 4: 1671-1683.
- Van Elsas JD, Seldin L, Penido EG. 1978. Ecology and taxonomy of *Bacillus* in Brazilian soils. *An Microbiol (Rio J)* 23: 59-78.
- Vesteinsdottir H, Reynisdottir DB, Orlygsson J. 2010. *Hydrogenophilus islandicus* sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an Icelandic hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Vick TJ, Dodsworth JA, Costa KC, Shock EL, Hedlund BP. 2010. Microbiology and geochemistry of Little Hot Creek, a hot spring environment in the Long Valley Caldera. *Geobiology* 8: 140-154.
- Vilas-Boas GT, Peruca AP, Arantes OM. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 53: 673-687.
- Vos PD. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer.
- Wang J, Zhang WW, Liu JN, Cao YL, Bai XT, Gong YS, Cen PL, Yang MM. 2009. An alkali-tolerant xylanase produced by the newly isolated alkaliphilic *Bacillus pumilus* from paper mill effluent. *Mol Biol Rep*.
- Ward DM, Cohan FM, Bhaya D, Heidelberg JF, Kuhl M, Grossman A. 2008. Genomics, environmental genomics and the issue of microbial species. *Heredity* 100: 207-219.
- Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28: 1942-1946.
- Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 14: 908-934.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Wood TM, McCrae SI. 1978. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochem J* 171: 61-72.
- Xu J. 2006. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Mol Ecol* 15: 1713-1731.
- Xu Q, Gao W, Ding SY, Kenig R, Shoham Y, Bayer EA, Lamed R. 2003. The cellulosome system of *Acetivibrio cellulolyticus* includes a novel type of adaptor protein and a cell surface anchoring protein. *J Bacteriol* 185: 4548-4557.
- Yang D, Weng H, Wang M, Xu W, Li Y, Yang H. 2010. Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain I15. *Mol Biol Rep* 37: 1923-1929.
- Yang SJ, Kataeva I, Wiegel J, Yin Y, Dam P, Xu Y, Westpheling J, Adams MW. 2009. Reclassification of '*Anaerocellum thermophilum*' as *Caldicellulosiruptor bescii* strain DSM 6725T sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Yin LJ, Lin HH, Chiang YI, Jiang ST. 2010. Bioproperties and purification of xylanase from *Bacillus sp.* YJ6. *J Agric Food Chem* 58: 557-562.
- Yoon KH. 2009. Cloning of a *Bacillus subtilis* AMX-4 xylanase gene and characterization of the gene product. *J Microbiol Biotechnol* 19: 1514-1519.
- Yuan Q, Adachi T, Takenaka S, Murakami S, Tanaka M, Aoki K. 2008. Production and accumulation of xylooligosaccharides with long chains by growing culture and xylanase of a mutant strain of *Bacillus pumilus* X-6-19. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 24: 1221-1227.
- Zhang XZ, Zhang Z, Zhu Z, Sathitsuksanoh N, Yang Y, Zhang YH. 2010. The noncellulosomal family 48 cellobiohydrolase from *Clostridium phytofermentans* ISDg: heterologous expression, characterization, and processivity. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 525-533.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Zhou G, Zheng D, Dou L, Cai Q, Yuan Z. 2010. Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. *Int J Food Microbiol* 137: 143-146.