



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS**

**MICROORGANISMOS PRODUTORES DE AMILASE, CELULASE,  
FOSFATASE, LIPASE, PROTEASE E UREASE NOS SOLOS  
AMAZÔNICOS DO RAMAL DO BRASILEIRINHO (MANAUS) E DE  
URUCU (COARI).**

**MANAUS/AM  
Dezembro – 2009**

**MICROORGANISMOS PRODUTORES DE AMILASE, CELULASE,  
FOSFATASE, LIPASE, PROTEASE E UREASE NOS SOLOS  
AMAZÔNICOS DO RAMAL DO BRASILEIRINHO (MANAUS) E DE  
URUCU (COARI).**

**KÉLIA LARISSA LOBO PRADO**

Orientador: Prof. Luiz Antonio de Oliveira, Ph.D.  
Co-orientador: Prof. Dr. Arlem Nascimento de Oliveira.

Dissertação apresentada à Universidade  
do Estadual do Amazonas para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia e Recursos Naturais.

Área de concentração: Biotecnologia.

MANAUS  
Dezembro - 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA BIBLIOTECA UEA - UNIVERSIDADE DO  
ESTADO DO AMAZONAS**

P813m Prado, Kélia Larissa Lobo

Microrganismos produtores de amilase, celulase, fosfatase, lipase, protease e urease nos solos amazônicos do ramal do Brasileirinho (Manaus) e de Urucu (Coari). / Kélia Larissa Lobo Prado. - Manaus: UEA, 2009.

67p. : il.

Dissertação (Mestrado) - apresentada à Universidade do Estado do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Biotecnologia. Orientador Luiz Antonio de Oliveira.

1. Atividade enzimática 2. Recursos naturais I.Título

CDU 579.22/23;579.8

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha amada mãe laciára e ao meu sobrinho querido Sílvio (*in memoria*). Vocês me ensinaram que somos capazes de suportar tudo quando se tem amor na vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de realizar este curso de mestrado devido à inestimável sensação das descobertas desta aventura!

Assim como tudo que nos cerca, existe um cenário e seus personagens atuando para fazer a história acontecer, são para todos eles que vão meus agradecimentos.

Agradeço ao professor Luiz Antonio de Oliveira por ter possibilitado a realização do trabalho, confiando no meu potencial desde o começo, pela amizade e o apoio durante todo o trabalho.

Agradeço ao Arlem por ter me contribuído desde o início, contribuindo com este trabalho, até aos sábados, domingos e feriados.

Aos queridos companheiros do laboratório Raimundo, Jonas Filho, André, Edivaldo, Orlando, obrigada pela grande ajuda e convivência que trouxeram alegrias e conforto, principalmente ao Raimundo pela imensa ajuda nas análises de solo.

Agradeço aos queridos companheiros de campo, Francisco Wesen e Joãozinho nas coletas das amostras nas florestas virgens da Floresta Amazônica onde aprendi muito.

Agradeço aos proprietários das terras do ramal do Brasileirinho que nos permitiram adentrar em suas áreas com muita hospitalidade.

Agradeço aos queridos da Universidade Federal do Amazonas, André Silva, Shayry Manenti, Luciana Leomil, Thyssia Bomfin, Diego e Rogério, que mesmo neste período de convívio cercado de contratempos, conquistei boas amizades, muito apoio e dedicação.

Aos companheiros do setor de microbiologia de solos, Arlem do Nascimento, Aloísio Jr., Alessandra Mari, Fabíola Rodrigues, Rogério Corrêa, Thana Esas..... pelos momentos de descontração e muita troca de experiências científicas.

Às minhas amigas Andréa Alexandra, Jucileuza, Dolores, Alessandra Rodrigues e Adriana pelos momentos de alegria, conforto e irreverências.

À Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Rede CTPetro da Amazônia e INPA pela estrutura física e o apoio acadêmico para a realização do trabalho.

À FAPEAM pela bolsa de estudo, à FINEP e Petrobrás pelo suporte financeiro.

À minha família, meus pais Iaciára e Prado, meus irmãos Keila, Káren e Raymar e meu sobrinho Pedro Henrique pelo incentivo, orações e companheirismo dentro e fora de casa.

Ao José Felipe Pinheiro, por toda dedicação, paciência e participação deste momento tão especial da minha vida.

E ao Sílvio Augusto, um grande guerreiro que com sua própria vida ensinou-me lições de vida, dentre elas, o dom maior de Deus: lutar pela vida com força, fé e paciência diante das maiores dificuldades.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação da ação catalisadora de lípases (JAEGER <i>et al.</i> , 1997).....	27
Figura 2 - Província Petrolífera e gás natural de Urucu, município de Coari, Amazonas.....	33
Figura 3 - Foto de Satélite mostrando a Cidade de Manaus, a Reserva Adolpho Ducke e a Comunidade do ramal do Brasileirinho.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações gerais sobre as amostras de solos de florestas e jazidas de Urucu e, áreas de agricultura do Brasileirinho .....	34
Tabela 2 - Resultado da análise granulométrica nos solos avaliados.....	39
Tabela 3 - Valor de pH, teores de carbono, nitrogênio, relação C/N e alumínio nos solos estudados.....	40
Tabela 4 - Teores de macronutrientes e micronutrientes e de fósforo encontrados nos solos de Urucu e do Brasileirinho .....	43
Tabela 5 - População de bactérias e fungos cultivados em meio de cultura contendo amido como fonte de carbono.....	44
Tabela 6 - População de bactérias e fungos cultivados em meio de cultura contendo caseína como fonte de carbono.....	47
Tabela 7 - População de bactérias e fungos cultivados em meio de cultura contendo carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono.....	49
Tabela 8 - População de bactérias e fungos cultivados em meio de cultura contendo uréia como fonte de carbono.....	51
Tabela 9 - População de bactérias e fungos cultivados em meio de cultura YMA modificado contendo fosfato de alumínio.....	52
Tabela 10 - População de bactérias e fungos totais e lipolíticos cultivados em meio de cultura contendo azeite de oliva como fonte de carbono.....	53



## RESUMO

Para entender melhor os ciclos biogeoquímicos de um ambiente, se faz necessário conhecer o solo, local onde ocorrem intensas reações refletindo na dinâmica geral do ambiente. O solo é um ambiente altamente complexo dominado pela sua fase sólida. Nele são encontrados diversos seres vivos, além de elementos que compõem a matéria inorgânica e a flora que está intimamente ligada a ele. Nas áreas de terra firme da Amazônia, estes solos são representados em sua maioria por Latossolos e Argissolos, considerados em sua maioria de baixa fertilidade e acidez elevada. Em áreas exploradas pelo homem, o processo de degradação/recuperação pode indicar o grau de modificação em que se encontra o solo. Com vistas a avaliar o nível de degradação/recuperação de áreas de jazidas e clareiras de Urucu e de cultivos de frutíferas na Comunidade do Brasileirinho, Manaus, foi realizada uma pesquisa avaliando-se o potencial enzimático da microbiota desses solos. Nos solos de florestas nativas de Urucu, como também em solos impactados pela exploração de petróleo de Urucu e em solos cultivados com espécies de importância econômica do Brasileirinho ocorrem microrganismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. Houve a produção das enzimas amilase, protease, celulase, urease e lipase por microrganismos isolados nesses solos. Os microrganismos produtores de fosfatase alcalina não foram detectados pela metodologia (diluição) adotada nos solos analisados. Houve a presença de microrganismos produtores de urease em todos os solos analisados. Os solos localizados no ramal do Brasileirinho não apresentaram população de microrganismos celulíticos na diluição de  $10^3$  da metodologia adotada. A amostra de floresta natural de Urucu denominada FN 05 apresentou a maior diversidade de enzimas, confirmando que não se encontra impactada, pois houve ocorrência de microrganismos produtores das enzimas amilase, protease, celulase, urease e lipase. O número e o tipo de espécies vegetais introduzidas para a recuperação das jazidas de Urucu não influenciaram na população de microrganismos produtores das enzimas de interesse do presente estudo.

**Palavras chave:** Enzimas microbianas, metabolismo microbiano, áreas degradadas; impacto ambiental.

## ABSTRACT

To better understand the biogeochemistry cycles of an environment, it is necessary to know the soil, where happen intense reactions contemplating the general dynamics of the environment. The soil is an highly environment complex dominated by its solid phase. In it is found several live organisms, besides elements that compose the inorganic matter and the flora that are intimately linked to it. In the up land areas of Amazonia, these soils are represented in its majority by Oxisols and Ultisols, considered in their majority, of low fertility and high acidity. In areas explored by the man, the degradation/recuperation process may indicate the modification degree of the soil. To evaluate the level of degradation/recuperation of gap areas in Urucu and of fruit cultivations in the Community of Brasileirinho, Manaus, a research was accomplished evaluating the enzymatic potential of the microbiota of those soils. In the soils of native forests of Urucu, as well as in impacted soils for the petroleum exploration of Urucu and in soils cultivated with species of economic importance of Brasileirinho occur microorganisms producing enzymes of biotechnological interest. There was found production of the enzymes amilase, protease, celulase, urease and lipase for microorganisms isolated in those soils. The microorganisms producing alkaline phosphatase was not detected by the methodology (dilution) adopted in the analyzed soils. There was the presence of microorganisms producing urease in all the analyzed soils. The soils located in the extension of Brasileirinho didn't present population of celulitic microorganisms at the dilution of  $10^3$  of the adopted methodology. The sample of natural forest denominated Urucu FN 05 presented the largest diversity of enzymes, confirming that it is not impacted, because there were microorganisms occurrence producing the enzymes amilase, protease, celulase, urease and lipase. The number and the type of vegetable species introduced for the recovery of the gap areas of Urucu didn't influence in the microorganisms population producing the enzymes of interest of the present study.

**Key words:** Microbe enzymes, microbial metabolism, degraded areas, environmental impact.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE TABELAS.....	08
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
3.1 SOLOS AMAZÔNICOS E SUAS PROPRIEDADES.....	15
3.2 MICRORGANISMOS DO SOLO.....	17
3.3 ENZIMAS.....	19
3.3.1 Definição de enzimas.....	19
3.3.2 Origem e forma de ocorrência.....	20
3.3.3 Caracterização das enzimas.....	21
3.3.4 Amilase.....	23
3.3.5 Celulase.....	24
3.3.6 Fosfatase alcalina.....	25
3.3.7 Lipase.....	27
3.3.8 Protease.....	29
3.3.9 Urease.....	30
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 LOCALIZAÇÃO E ÁREA DE ESTUDO.....	32
4.1.1 Áreas estudadas: jazidas, clareiras, florestas de Urucu e área agrícolas do Brasileirinho.....	34
4.2 COLETA DE SOLO.....	34
4.3 MEIO DE CULTURA.....	35
4.4 AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO SOLO.....	35
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MEIO SÓLIDO.....	36
4.5.1 Atividade amilolítica.....	36
4.5.2 Atividade celulítica.....	36
4.5.3 Atividade lipolítica.....	36
4.5.4 Atividade proteolítica.....	37
4.5.5 Atividade ureolítica.....	37
4.5.6 Solubilização de fosfato de alumínio.....	37
4.6 ANÁLISE DO MATERIAL PARA AVALIAR TEORES DE MACRO E MICRO NUTRIENTES.....	38
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A exploração de petróleo e gás natural na Amazônia tem como consequências negativas, a formação de clareiras e jazidas na floresta e a possibilidade de derramamento desses produtos nos solos e águas regionais.

Toda a produção regional desses produtos e derivados vem da região de Urucu, distante cerca de 600 km de Manaus, Estado do Amazonas. As clareiras e jazidas abertas em plena floresta na Província Petrolífera de Urucu estão sendo recobertas com nova vegetação com apoio de instituições de ensino e pesquisas, como o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Universidade Estadual do Amazonas (UEA), EMBRAPA, Museu Emílio Goeldi, Universidade Federal do Pará (UFPA), FUCAPI, que compõem a rede de pesquisas Rede CTPetro Amazônia. Há nessa região, clareiras e jazidas em diversas situações de idade, áreas, plantios, manejos de solos, etc.

Por outro lado, o ramal do Brasileirinho, uma área rural localizada no município Manaus, na zona leste, é constituído de propriedades rurais onde intensa atividade agrícola é realizada por proprietários de terra. Diversas propriedades dessa comunidade tem sido apoiadas pelo INPA, com técnicas de manejo de solo, com intuito de melhorar os rendimentos e produtividade visto que essas áreas possuem muitas adversidades.

Para entender melhor os ciclos biogeoquímicos de um ambiente, se faz necessário conhecer o solo, local onde ocorrem intensas reações refletindo na dinâmica geral do ambiente. O solo é um ambiente altamente complexo dominado pela sua fase sólida (BORNEMAN, 1999). Nele são encontrados diversos seres vivos, além de elementos que compõem a matéria inorgânica e a flora que está intimamente ligada a ele. Nas áreas de terra firme da Amazônia, estes solos são representados em sua maioria por Latossolos e Argissolos, considerados em sua maioria, como de baixa fertilidade e acidez elevada, características que limitam seus usos na agricultura regional (NICHOLAIDES *et al.*, 1983; EMBRAPA, 1997).

Nos solos de exploração de petróleo e gás natural da Província Petrolífera de Urucu e nos do Brasileirinho, como em outros, estão presentes microrganismos

capazes de interagir entre si e influenciar no habitat contribuindo para a recuperação de áreas degradadas. A verificação da ocorrência de enzimas microbianas pode ser importante na avaliação da recuperação dessas áreas, já que os aspectos ambientais desempenham um importante papel na determinação das interações entre microrganismos e as trocas nas populações de microrganismos no solo (ELSAS *et al.*, 1998). Portanto, a verificação da ocorrência de microrganismos produtores de hidrolases e liases no solo pode ser usada como indicador biológico de recuperação dessas jazidas e indicador em potencial ao influenciar na nutrição de espécies frutíferas de interesse econômico das áreas agrícolas. Esse tipo de estudo ainda não foi incorporado nas pesquisas locais, podendo antecipar a avaliação como um indicador de qualidade quanto ao grau de recuperação biológica dos solos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar as possíveis ocorrências de microrganismos produtores de enzimas de interesse ecológico, industrial e agroflorestal nos solos de florestas nativas e jazidas de exploração de gás e petróleo da Província Petrolífera de Urucu (Coari) e propriedades agrícolas rurais do ramal do Brasileirinho (Manaus).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar por meio de cultivo tradicional de microrganismos, o potencial enzimático dos solos de Urucu e do Brasileirinho.
- Avaliar as atividades enzimáticas dos microrganismos como índice de qualidade dos solos a serem utilizados para fins agrícolas (Brasileirinho) ou para serem restaurados por uma nova vegetação (Urucu).

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 SOLOS AMAZÔNICOS E SUAS PROPRIEDADES

A Amazônia é uma região tropical imensa, com alta diversidade biológica e com muita água, onde a floresta interage fortemente com a atmosfera, rios e lagos (DAVIDSON; ARTAXO NETO, 2004). A floresta tropical densa de terra firme, que cobre a maior parte da região e que se situa predominantemente sobre solos de baixa fertilidade química natural, deve sua sobrevivência e produtividade à sua alta diversidade vegetal, composta por espécies nativas adaptadas às condições climáticas e nutricionais do solo (ANDRESON; INGRAN, 2003). Essas espécies teriam uma baixa demanda por nutrientes minerais e dependeriam, então, de uma eficiente reciclagem da matéria orgânica produzida pela própria floresta.

A reciclagem da matéria orgânica depende fortemente da atividade biológica que, em condições naturais na floresta, é muito favorecida pela temperatura e umidade apropriadas da região (LUIZÃO, 2004).

Os solos da região amazônica são antigos e alguns originados na era paleozóica. Os escudos são compostos de rochas que contêm algumas manchas de sedimentos do período paleozóico a mesozóico (60 a 400 milhões de anos atrás). O vale é formado por sedimentos fluviais de textura grossa, depositados entre o cretáceo e o terciário. Os solos amazônicos são resultados do intenso processo de lixiviação que vem ocorrendo há milhões de anos. O clima da região – quente e úmido – favorece processos de intemperização das rochas e a lixiviação dos metais alcalinos e alcalinos terrosos. A exposição do solo por longo tempo à ação das chuvas abundantes e de temperaturas elevadas, aliadas às grossas texturas do substrato geológico, permite fácil drenagem da água de percolação, tornando o intemperismo mais intenso (SCHUBART *et al.*, 1984).

Na Amazônia predominam duas classes de solo, os Latossolos e os Argissolos, que, juntos, representam cerca de 70% da região (RODRIGUES, 1994). Esses solos são profundos, bem drenados e apresentam, em geral, boas propriedades físicas. Do ponto de vista químico, esses solos são fortemente ácidos,

com baixa fertilidade natural, elevada acidez e alta saturação com alumínio. Essas características dificultam o bom desenvolvimento das plantas e, por consequência, limitam os seus usos na agricultura regional (COCHRANE *et al.*, 1982; ALFAIA; OLIVEIRA, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Cerca de 90% dos solos da região são deficientes em N e P. Essa deficiência natural é ainda mais acentuada, sobretudo em solos devido às práticas agrícolas inadequadas (NICHOLAIDES *et al.*, 1983; EMBRAPA, 1990). Em solos de superfície mais recente pode haver baixa saturação de bases embora moderada ou alta quantidade de minerais intemperizáveis (VIEIRA, 1975). A acidez do solo tem influência negativa no crescimento das plantas. Em geral, em solos ligeiramente ácidos, o suprimento de P, Mg, K, Ca às plantas é freqüentemente marginal ou mesmo deficiente. Já em solos com toxidez de alumínio e acidez extremamente alta, é o alumínio o principal fator dominante que limita o crescimento das plantas (OLIVEIRA, 1994; CHAGAS -JÚNIOR, 2000).

Contudo, ainda que existam muitos aspectos negativos, a dinâmica da exuberante floresta amazônica ocorre em solos pobres e ácidos, sendo garantida por um mecanismo particular de disponibilidade e retenção de nutrientes essenciais à sua manutenção, ao lado da existência das condições básicas de calor e umidade (FRANKEN *et al.*, 1985). A elevada eficiência na reciclagem de nutrientes observada nas florestas tropicais tem sido correlacionada com a sua alta diversidade biológica. A reciclagem de nutrientes se contrapõe à lixiviação dos solos, pois representa um mecanismo de conservação de nutrientes no ecossistema, promovendo ao mesmo tempo, a produtividade biológica e o bom estado nutricional das plantas (SCHUBART *et al.*, 1984).

A dinâmica do aproveitamento dos nutrientes no sistema Amazônico é mais intensa no período chuvoso, quando o aumento da umidade favorece as atividades da biota do solo no processo de mineralizar a matéria orgânica acumulada durante o período de baixa precipitação (WALKER; FRANKEN, 1983).

Considerando que a ciclagem de nutrientes, praticamente fechada, assegura a manutenção da floresta de terra firme, a substituição da cobertura vegetal por pastagens ou outras atividades agrícolas leva à diminuição de nutrientes do compartimento biomassa, transferindo-os temporariamente ao solo (FERREIRA *et al.*, 2006).

Observando toda a dinâmica, é possível perceber que os vegetais cumprem



um importante papel na circulação dos nutrientes minerais. Esses são retirados pelas raízes de camadas profundas do solo, mantidos acima do nível do solo no corpo das plantas e, finalmente retornam ao solo. Especialmente as espécies que possuem um extenso e profundo sistema radicular são capazes de buscar nutrientes que foram carregados para as camadas mais profundas do solo. Após a degradação da liteira originada dessas árvores, esses nutrientes absorvidos retornam aos horizontes superficiais do solo, disponíveis para as espécies que possuem raízes superficiais (LANCHER, 2004).

As raízes são órgãos de importância vital para as plantas, porque além de garantirem o suporte físico, são responsáveis pela absorção de água e dos nutrientes do solo (MOREIRA, 2006). A presença de raízes e modificações físicas e químicas que elas promovem, criam um ecossistema muito especializado, no qual a população microbiana é altamente favorecida, atingindo populações até 100 vezes superiores ao solo adjacente. Esta zona de influência das raízes é a chamada rizosfera, definida pelo pesquisador alemão HILTER em 1904. É nesta região que ocorre a maior parte das atividades físicas, químicas e biológicas devido à interface de comunicação entre as plantas e o solo (SIQUEIRA; FRANCO, 1988).

Sob essa ótica, a situação é mais grave nas áreas de jazidas como ocorre na Província Petrolífera de Urucu, onde os solos também pobres e ácidos sofrem severamente com a retirada mecânica da camada superficial do solo (camada orgânica) para limpar e facilitar na perfuração em busca de gás e petróleo. O mesmo pode-se dizer de algumas áreas usadas por produtores agrícolas, como na comunidade do Brasileirinho, que passam por níveis variáveis de degradação.

### 3.2 MICRORGANISMOS DO SOLO

Os microrganismos representam a fonte mais rica em diversidade química e molecular da natureza, constituindo a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos e a cadeia trófica, além de manter relações vitais com organismos superiores (HUNTER-CEVERA, 1998).

Poucos ambientes na Terra fornecem tão grande variedade de microrganismos como o solo. As bactérias, fungos, algas, protozoários e vírus formam a coleção microscópica que pode alcançar um total de bilhões de organismos por grama. A diversidade de microrganismos é tão vasta quanto

desconhecida. Um grama de solo pode conter até 10 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies (ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001).

O número de espécies microbianas identificadas cresce a cada ano, sendo descritos mais de 47.000 fungos, 30.000 protozoários, 26.000 algas, 5.000 bactérias e 1.000 vírus. Esses números são, no entanto, pequenos diante do total de espécies, estimado em cerca de dois milhões (WILSON, 1988; ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001). Isso significa que foram descobertas e identificadas até o presente momento, menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas (TRÜPER, 1992; ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001).

Alguns autores Pace (1986); Torsvik e Ovreás (2002) associam estes dados ao fato de que até pouco tempo atrás, os microrganismos deveriam ser cultivados para serem identificados, tornando, portanto, o método de cultivo-dependente um fator limitante. O tamanho microscópico dos microrganismos, a frequência de ocorrência microbiana, a sazonalidade, e em muitos casos, a dependência de hospedeiro e/ou substrato específico para sua sobrevivência e multiplicação também podem ser considerados relevantes limitações para a descrição de novos táxons microbianos (ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001).

O estudo da diversidade microbiana nos solos é essencial para definir estratégias para a preservação da biomassa e proporcionar parâmetros para desenvolver sistemas que indicam alterações ambientais, associadas geralmente, pela utilização não sustentável de solos agrícolas. Além disso, a diversidade microbiana benéfica dos solos pode ser tomada como um suposto indicador da qualidade do solo. O entendimento atual do conceito de qualidade do solo compreende o equilíbrio entre os condicionantes geológicos, hidrológicos, químicos, físicos e biológicos (BRUGGEN; SEMENOV, 2000; SPOSITO; ZABEL, 2003).

O conceito de qualidade do solo surgiu no final da década de 70, e durante os 10 anos seguintes, esteve muito associado ao conceito de fertilidade. Acreditava-se, por exemplo, que um solo quimicamente rico era um solo com alta qualidade, isto porque tinha a capacidade de promover a produção agrícola. No entanto, a percepção do conceito de qualidade do solo evoluiu, principalmente nos últimos 10 anos. Em um entendimento mais amplo, não basta apenas o solo apresentar alta fertilidade, mas também, possuir boa estruturação e abrigar uma alta diversidade de microrganismos (KARLEM *et al.*, 2003; ZILLI *et al.*, 2003).

A diversidade microbiana tem figurado como um importante indicador da

qualidade do solo por estar na base da cadeia trófica e intrinsecamente ligada aos diversos processos ecológicos do solo (ZILLI *et al.*, 2003). As interações plantas-microrganismos são controladas geneticamente por macro e microsimbiontes, numa relação bastante complexa e ainda pouco conhecida. Em parte, esse fato é atribuído às limitações das metodologias convencionais utilizadas até recentemente. Os meios de culturas definidos, simples ou complexos, não provêm fontes energéticas ou nutricionais adequadas ao crescimento dos membros representativos de todas as comunidades microbianas presentes e, conseqüentemente, produzem resultados quantitativos subestimados (MARRIEL, 2005).

A microbiologia tem trazido muitos benefícios científicos, no conhecimento aprofundado das funções exercidas pelos organismos nos ambientes e também das interações com outros componentes vivos. A descoberta de novos microrganismos tem ajudado na produção de novos antibióticos, agentes terapêuticos, polímeros, enzimas para aplicações diretas nas indústrias, biorremediação de poluentes, recuperação de minérios, entre outros (ASSAD, 2000).

A microbiota do solo é importante para as atividades biológicas existentes na natureza, pois auxiliam na decomposição de substâncias orgânicas e seus componentes básicos, como água, minerais e gás carbônico, contribuindo para reiniciar o ciclo vital, garantindo assim, a continuidade da vida (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Os microrganismos que colonizam o solo produzem uma imensa quantidade de metabólitos, dentre eles, as enzimas. Estas estão distribuídas na natureza e são produzidas por todos os seres vivos, algumas em grandes quantidades e outras, principalmente as envolvidas em mecanismos regulatórios, em menores concentrações. Apesar dessa ocorrência ampla, as enzimas de origem microbiana representam uma das melhores fontes devido a sua ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética (ALTAMIRANO *et al.*, 2000).

### 3.3 ENZIMAS

#### 3.3.1 Definição de enzima

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos, quando atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos (ROSA; PANTANO FILHO, 2003).

As enzimas são substâncias naturais envolvidas em todos os processos bioquímicos que ocorrem nas células vivas, sejam plantas ou animais, desde os mais simples, como formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos. Muito embora, a maioria das enzimas sejam endocelulares, algumas são exocelulares e são excretadas para fora da célula viva, como por exemplo, as amilases fúngicas (SPIER *et al.*, 2006).

Segundo Tortora *et al.* (2000), as enzimas são de especial importância em fermentações industriais, uma vez que todos os processos de fermentação resultam da atividade enzimática de microrganismos. As enzimas são proteínas vitais que catalisam reações bioquímicas com grande especificidade, sendo capazes de aumentar em até  $10^{14}$  vezes algumas reações sem querer condições extremas de pH, pressão e temperatura (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Atualmente são conhecidas cerca de 1.500 enzimas, mas a diversidade pode ser muito superior a esse número, principalmente em regiões de alta diversidade biológica como na floresta Amazônica. Estima-se que na Amazônia se encontram cerca de 16% das espécies vegetais do planeta, do total de 500.000, compreendendo aproximadamente 75.000 espécies na região (OLIVEIRA, L. A ., informação pessoal)

### **3.3.2 Origem e forma de ocorrência**

As enzimas existentes no solo têm origem nos organismos, vegetais ou animais. Mas, muitos microrganismos do solo produzem enzimas extracelulares para degradar biomoléculas de elevado peso molecular que os mesmos não conseguem absorver de modo direto.

Estudos com *Arpergillus oryzae* revelaram que enzimas são liberadas em certa seqüência: carboidrases e fosfatases, proteases e esterases, catalases (MELO; CAMPOS-TAKAKI, 1989). As enzimas que fazem parte do conteúdo celular são liberadas após a morte da célula devido à lise ou a alterações na permeabilidade celular.

O tipo de enzima pode variar dependendo do local (planta ou solo) onde ocorre. Estermann e McLaren (1961) examinaram a distribuição de fosfatase, invertase e urease entre as raízes e a rizosfera de plantas de cevada, concluindo que a fosfatase e a invertase poderiam ser atribuídas principalmente às raízes,

enquanto que a urease, aos organismos da rizosfera.

### 3.3.3 Caracterização das enzimas

As enzimas já encontradas na natureza têm sido utilizadas desde a Antigüidade na produção de inúmeros produtos alimentícios, como queijo, fermento, pães, cerveja, vinho, vinagre, além de têxteis como linho, couro. Atualmente, as enzimas microbianas são amplamente utilizadas nas indústrias de alimento (KIRK *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003), detergente (BRZOZOWSKI *et al.*, 2000; MCCOY, 2000), biocombustível (TAYLOR *et al.*, 2001), farmacêutica (WESTERS *et al.*, 2004) dentre outras.

Em 1961, as enzimas foram classificadas pela IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) através do número EC, que as classifica de acordo com a sua classe e com a reação que catalisa.

As vantagens do uso de enzimas são muitas, tais como, serem catalisadores eficientes, aceitáveis ecologicamente, atua em condições brandas, são mutuamente compatíveis com seus substratos, não são limitadas a papel natural, podem catalisar um grande espectro de reações.

Atualmente, a substituição de catalisadores químicos em processos industriais por catalisadores biológicos, deve-se principalmente às condições brandas de pH e temperatura em que as enzimas geralmente atuam. Assim, o uso dessas macromoléculas pode reverter o processo em benefícios econômicos, uma vez que ocorre a redução no tempo, na energia elétrica gasta, e ainda é possível preservar os tanques reacionais, não mais submetidos a altas pressões, temperaturas e corrosões. Além disso, com seu uso, as enzimas possibilitam a diminuição dos rejeitos industriais que podem comprometer o meio ambiente (SAID; PIETRO, 2004).

Outro aspecto a se considerar são as reações mediadas por enzimas como alternativas eficazes para métodos químicos, geralmente dispendiosos. A demanda por enzimas de uso industrial, principalmente aquelas com origem microbiana, é crescente devido a sua aplicação em diversos processos. Estas macromoléculas têm grande utilização em diversas áreas, como indústrias de alimentos, farmacêuticas, de detergentes, têxteis e cosméticas (AGUILAR, 1986).

As enzimas estão distribuídas na natureza e são produzidas por todos os seres vivos, algumas em grandes quantidades e outras, principalmente as envolvidas em

mecanismos regulatórios, em menores concentrações.

Apesar dessa ocorrência ampla, as de origem microbiana representam a melhor fonte devido à sua ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética (ALTAMIRANO *et al.*, 2000).

No solo, o metabolismo enzimático microbiano é importante na degradação da matéria orgânica proveniente de plantas e animais, e na liberação de nutrientes e elementos de origem mineral necessários para o desenvolvimento das plantas (NANNIPIERI *et al.*, 1990). O processo de mineralização da matéria orgânica é catalisado por diferentes enzimas, produzidas na sua maioria pelos microrganismos do solo (AOKI *et al.*, 1995), cuja importância estaria relacionada à possibilidade de pressupor as reações de decomposição que poderão ocorrer no solo e a disponibilidade de compostos importantes para a nutrição das plantas (TIWARI *et al.*, 1988). Na degradação de celulose, por exemplo, as reações envolvidas tornam o carbono disponível para o crescimento de microrganismos (TABATABAI, 1994).

As enzimas são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores (carboidratos em açúcares, por exemplo), de catalisar alterações estruturais dentro de uma molécula (caso da isomerização da glicose em frutose), assim como podem ajudar a construir moléculas específicas de material celular (MONIZ *et al.*, 1988).

As enzimas conectam-se às substâncias reagentes e enfraquecem certas ligações químicas, de modo que menos energia (de ativação) é necessária para que as reações ocorram (MONIZ *et al.*, 1988).

Enzimas são proteínas globulares que atuam como catalisadores biológicos conduzindo as reações bioquímicas nas células dos organismos vivos. Quimicamente, estas macromoléculas contêm uma ou mais cadeias de centenas de aminoácidos numa complexa estrutura tridimensional, que é muito importante para a sua ação. Como em toda a catálise, uma catálise enzimática é definida como uma reação de “parceria” que aumenta a velocidade de uma reação química, sem que o catalisador sofra mudanças em todo o processo. Esta definição implica que uma única molécula de enzima é capaz de converter muitas moléculas de substrato durante o seu tempo de vida (SAID; PIETRO, 2004).

A taxa de conversão destas reações é chamada de atividade de uma enzima. As enzimas diferem dos catalisadores químicos em muitos aspectos, tais como: (i) altas taxas de reação; (ii) condições de reação não agressivas e (iii) alta

especificidade de reação (CALL; MUCKE, 1997).

Pelo exposto acima, o uso e produção de enzimas têm se tornado uma das áreas de maior interesse da indústria biotecnológica. As enzimas têm sido usadas pelo homem por vários séculos, mesmo antes do conhecimento de sua natureza essencial (FULLBROOK, 1983).

### 3.3.4 Amilases

O amido é um polissacarídeo muito abundante na natureza, sendo encontrado em diversos vegetais (milho, mandioca, batata, trigo, etc.). É constituído por longas cadeias de moléculas de glicose, retas e ramificadas ligadas entre si. Entretanto, apresenta o inconveniente de não ser diretamente fermentado pela levedura, necessitando de um processo de hidrólise preliminar (GIORDANO, 1992).

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise da amilopectina, da amilose e do glicogênio. A hidrólise do amido pode ser de meia vida operacional (ZANIN, 1989). Analogamente, a imobilização de microrganismos é realizada através do uso de enzimas, tais como a alfa-amilase e a amiloglicosidase (AMG). A primeira atua no interior da cadeia de amido, quebrando-a em oligossacarídeos de menor peso molecular. A amiloglicosidase, por sua vez, atua nos extremos da molécula, liberando unidades sucessivas de glicose (GIORDANO, 1992).

Em muitos processos as enzimas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para processos de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, através da biodegradabilidade e do menor consumo de energia. Elas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas (UEDA *et al.*, 2004). O setor têxtil já utiliza várias enzimas, principalmente na fiação, tingimento, acabamento e no tratamento de resíduos poluidores.

Segundo Auterinen (2006) a primeira enzima de origem microbial foi  $\alpha$ -amilase que serve para a retirada da goma natural. E hoje, outras enzimas também são empregadas no setor têxtil como a pectinase, a lipase e a hemicelulase. No acabamento do índigo há o uso da celulase para dar efeito de "stonewashed", em que a pedra pome pode ser substituída ou utilizada em conjunto para desbotar a cor do te-

cido. No tratamento dos resíduos de corantes. Segundo Kuns e Duran (2002), existem diversas enzimas que degradam os corantes com a lignina e manganês. São elas a peroxidase, do fungo *Phanerochaete chrysosporium* e a azoredutase do *P. chrysosporium*, *Pseudomonas sp*, ou *Sphingomonas sp*. para azocorantes (KUNS; DURAN, 2002).

### 3.3.5 Celulases

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo (BAYER; LAMED, 1992) e pode ser hidrolisada com ácidos. A degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem. Na natureza, esses processos representam a maior fonte de carbono para o solo (LYNCH *et al.*, 1981).

Na natureza existe grande variedade de microrganismos que produzem celulases. Apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulíticos, isto é, capazes de degradar a celulose, natural (ROBSON; CHAMBLISS, 1989). A hidrólise da celulose, além de ser realizada pela ação de enzimas celulíticas produzidas pela flora bacteriana desses microrganismos, também pode ser obtida por meio de tratamentos ácidos ou básicos (MARCONDES *et al.*, 1983).

A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final da glicose. E as celulases, porém por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para o desencadeamento desse processo de degradação (THIEMANN *et al.*, 1980).

O complexo enzimático das celulases constitui-se de um conjunto de hidrolases glicosídicas, secretadas por microrganismos, plantas e alguns animais. Estas enzimas são glicoproteínas de peso molecular entre 50 e 90 kDa, capazes de romper as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose, principal polímero presente nas paredes de células vegetais, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (SILVA, 1997).

As celulases são encontradas na forma individualizada, mas também podem formar um complexo enzimático multipolimérico denominado de celulosoma, tal como produzido por *Clostridium thermocellum*. Contudo, quando os componentes



dissociam-se, perdem até 70% de sua atividade celulítica (SAID; PIETRO, 2004).

As principais aplicações das celulasas destinam-se à área têxtil e de detergentes. Estas enzimas também são utilizadas como aditivos na preparação do malte de cerveja, em processos de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcalóides e amido. Na área de alimentação animal, são comercializadas como componentes de indutores de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestão e absorção de alimentos ricos em fibras de celulose (SILVA, 2002).

Na área energética, essas enzimas são empregadas em plantas-piloto para a obtenção de hidrolisados de celulose, os quais são utilizados para fermentação visando produtos de interesse, por exemplo, o etanol (SAID; PIETRO, 2004).

### **3.3.6 Fosfatase Alcalina**

Fosfatase Alcalina (EC 3.1.3.1) é uma hidrolase, isto é, é uma enzima capaz de remover grupos fosfatos de um grande número de moléculas diferentes, incluindo nucleotídeos, proteínas e alcalóides; como o próprio nome sugere, essa enzima é mais ativa em soluções alcalinas. O processo de remoção desses grupos fosfatos é conhecido como defosforilação. A fosfatase alcalina é produzida por diversos órgãos e tecidos, como por exemplo: ossos, fígado e placenta dos mamíferos.

Os microrganismos são reconhecidos por sua habilidade em promover transformações bioquímicas dos nutrientes e por sua importância em prover os elementos nutritivos de interesse às plantas, principalmente N, P e S (PAUL; CLARK, 1989). Pode-se inferir essas transformações pela quantificação do número de microrganismos ou por sua atividade (NANNIPIERI *et al.*, 1978; VIEIRA; NAHAS, 1998). Pelas transformações dos compostos fosfatados, por meio de reações de solubilização do fósforo inorgânico e de mineralização do fósforo orgânico, forma-se fosfato solúvel que pode ser utilizado pelas plantas para seu crescimento (BERTON *et al.*, 1997). Contudo, pouca importância tem sido dada aos compostos orgânicos fosfatados uma vez que em inúmeros solos constituem a maior fração do fósforo, podendo contribuir para o crescimento de plantas (NAHAS, 2002).

Entre os elementos essenciais, o fósforo (P), logo após o nitrogênio (N), ocupa posição de destaque em relação aos seres vivos, tendo em vista sua atuação

estrutural, funcional, e na transferência de energia (NAHAS, 1991). Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos num esforço de encontrar alternativas para suprir as necessidades de P para as plantas a um custo menor. E nesse sentido muitas das pesquisas estudaram a possibilidade de aplicação direta dos fosfatos naturais no solo (BOLLAND; GILKES, 1995; OMAR, 2004), que, no entanto, apresentam limitações na disponibilidade de P. Por isso, são recomendados na formação e manutenção de pastagens e capineiras, em reflorestamentos e na formação de culturas perenes (LOPES; GOEDERT, 1987).

A fosfatase alcalina se tornou uma ferramenta muito útil nos laboratórios de Biologia Molecular. É empregada principalmente na remoção dos grupos fosfatos das extremidades 5' das moléculas de DNA, impedindo a ligação dessa extremidade com outras moléculas de DNA. A fosfatase alcalina também é muito utilizada para marcação radioativa. A remoção desses fosfatos permite a substituição desses por grupos radioativos, possibilitando a identificação futura dessas moléculas. Na indústria é utilizada como marcador na pasteurização.

Depois do N, o fósforo (P) é o nutriente que mais limita o crescimento de plantas e microrganismos, apesar de ser abundante nos solos em ambas as formas orgânicas e inorgânicas (FOHSE *et al.*, 1988; PEREIRA; BLISS, 1989; STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999; ZAHRAN, 1999). Contudo, em muitos solos, principalmente da Amazônia, são deficientes em P na forma disponível para as plantas.

Essa baixa disponibilidade de P nos solos é devido à alta reatividade do P solúvel com cálcio, ferro ou alumínio que atuam na sua precipitação (CHAGAS JÚNIOR, 2001). Fosfatos inorgânicos em solos ácidos estão associados com compostos de Al e Fe, enquanto que fosfatos de cálcio são as formas predominantes em solos alcalinos (SANCHEZ *et al.*, 1982; NICHOLAIDES *et al.*, 1983; RAIJ, 1991). Considerando que uma forma de prover fosfato disponível para as plantas é através da atividade mineralizadora microbiana do fósforo orgânico, avalia-se a influência da planta, dos fertilizantes e da calagem nas populações de microrganismos produtores de fosfatases ácida e alcalina.

No solo, o P é sujeito a muitos processos biogeoquímicos que alteram a sua disponibilidade. Entre esses processos destacam-se a dissolução de fosfatos, que os torna disponíveis para as plantas (GOEDERT *et al.*, 1983; WHITELAW, 2000).

O uso de microrganismos capazes de solubilizar fosfatos pode ajudar a aumentar a disponibilidade de fosfatos para o crescimento de plantas leguminosas e não leguminosas (ANTOUN *et al.*, 1998; PEIX *et al.*, 2001; VESSEY, 2003; SCHONFELD *et al.*, 2005).

A detecção visual e a estimativa quantitativa da habilidade de microrganismos em solubilizar fosfatos pouco solúveis têm sido possível usando métodos em placas de Petri com meio de cultura, pelo aparecimento de uma zona translúcida ao redor da colônia solubilizadora em meio contendo fosfato mineral insolúvel (principalmente fosfato de alumínio ou de cálcio) como única fonte de fósforo (HARA; OLIVEIRA, 2004).

É possível que o efeito microbiano na rizosfera de plantas pode proporcionar uma resposta fisiológica nas plantas hospedeiras, como a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos, tornando disponível para as plantas.

### 3.3.7 Lipases

Lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam hidrólise de triacilgliceróis em diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos livres e glicerol (SAXENA *et al.*, 2003a) na interface água-lipídeo (Figura 1). Na ausência de água ou em condições microaquosas, catalisam a reação reversa de síntese (KAUSHIK *et al.*, 2006), entre outras.

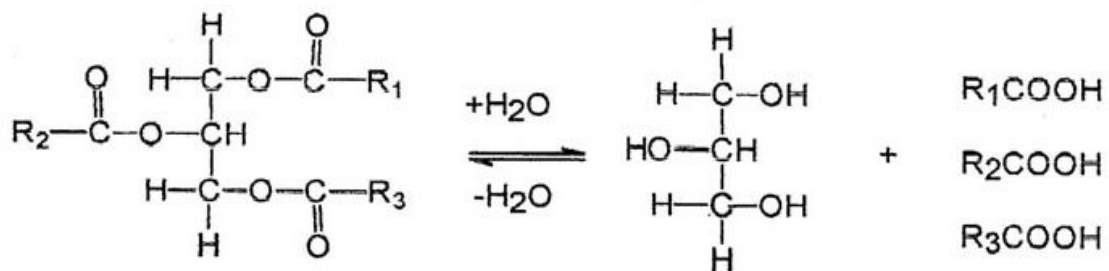


Figura 1. Reação da ação catalisadora de lipases (JAEGER *et al.*, 1997).

As estruturas tridimensionais das lipases de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana foram determinadas em 1990 e desde então outras estruturas de lipases microbianas têm sido determinadas (JAEGER *et al.*, 1997).

Todas as lipases cujas estruturas tridimensionais são conhecidas pertencem à classe das  $\alpha/\beta$  hidrolases. Juntamente com outras hidrolases, contêm um domínio central composto por uma e até oito diferentes folhas  $\beta$  conectadas às seis  $\alpha$ -hélices. O sítio ativo, constituído por uma tríade catalítica composta por serina (S), glutamato (E) ou aspartato (D), e histidina (H) (SCHMIDT-DANNERT, 1999), é freqüentemente protegido por uma “tampa” em  $\alpha$ -hélice, composta principalmente por resíduos hidrofóbicos. O movimento da estrutura que compõe a tampa confere às lipases pelo menos duas conformações distintas, sendo a primeira denominada “fechada” ou menos ativa pelo não deslocamento da tampa em meios aquosos e a segunda denominada “aberta” ou mais ativa, pelo deslocamento da tampa na presença de substratos hidrofóbicos (PETKAR *et al.*, 2006).

As lipases são enzimas amplamente distribuídas na natureza e têm por função catalisar a hidrólise de óleos e gorduras, triglicerídeos, liberando ácidos graxos livres. Lipases de diferentes fontes têm sido utilizadas na indústria de alimentos para melhorar a capacidade de liberar compostos de aroma dos produtos, porém essas enzimas catalisadoras ainda apresentam um custo elevado. A produção de lipase por microrganismos vem ganhando importância por ser um produto natural e por garantir uma especificidade desejada com diversas finalidades. Outros fatores que tornam estas enzimas atrativas do ponto de vista comercial podem ser citados (HASAN *et al.*, 2006):

- Muitas lipases são ativas em condições ambientes ou em baixas temperaturas, o que permite seu uso em condições mais brandas, reduzindo assim a degradação de produtos formados, o que geralmente ocorre em altas condições de temperatura e pressão;
- Devido à especificidade, a formação de produtos indesejáveis, que normalmente ocorre nos processos convencionais, é reduzida ou eliminada;
- A maior estabilidade apresentada pelas enzimas de microrganismos termoestáveis, livres e/ou imobilizadas, permite, por exemplo, o uso em reatores com temperaturas maiores que 70°C por períodos de tempo prolongados.

Diversos métodos podem ser utilizados para comprovar qualitativamente a atividade de produção da lipases. As colônias lipolíticas são detectadas pela presença no meio opaco de uma zona clara ao redor delas (HASAN *et al.*, 2006).

Aplicações promissoras de lipases são encontradas em processos orgânicos, formulação de detergentes, síntese de biossurfactantes, indústria óleoquímica, indústria de laticínios, indústria agroquímica, manufatura de papel, indústrias de nutrição, cosméticos e processos farmacêuticos (SHARMA *et al.*, 2001).

### 3.3.8 Proteases

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e têm aplicação em diferentes indústrias, como de alimentos, têxtil, farmacêutica e de detergentes (MADIGAN, 1996; HORIKOSHI, 1999; KANEKAR, 2002; RIVAS, 2004). As proteases formam uma classe de enzimas que ocupam lugar de interesse com respeito às suas aplicações nos campos fisiológicos e comerciais. Os microrganismos proteolíticos parecem ser as mais promissoras fontes de proteases, por produzirem uma maior variedade de enzimas específicas, em comparação às plantas ou aos animais (DINIZ; MARTIN, 1999). Proteases microbianas, principalmente fúngicas, apresentam vantagens, como fácil obtenção e recuperação (KUMAR *et al.*, 2005). Aproximadamente 60% do total das enzimas industriais são proteases, amplamente empregadas na produção de couro e na indústria de alimentos (GODFREY e REICHEL, 1983). Nesta última, as proteases são utilizadas como auxiliares no processamento de cerveja, vinho, cereais, leite, laticínios, chocolate, ovos, produtos a base de ovos, produtos a base de carne e de peixe, legumes e na produção de proteína hidrolisada e flavorizantes (HAARD, 1992). Microorganismos produtores de proteases são comuns entre os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Aspergillus*, *Streptomyces* e *Rhizopus* (DINIZ; MARTIN, 1999).

A utilização de proteases em formulações de detergentes requer que estas enzimas possuam elevada atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, que sejam efetivas em baixas quantidades (0,4-0,8%) e compatíveis com vários detergentes comerciais (KUMAR, 1999). Estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de proteases esteja relacionado ao meio de

cultura utilizado para o crescimento do microrganismo. Portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos de produção (JOO; CHANG, 2005).

Recentemente, vários resíduos agroindustriais têm sido usados como substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção destas enzimas em larga escala. O soro de leite, por exemplo, é um resíduo altamente rico em proteínas, respondendo por 20% das proteínas encontradas no leite (SISO, 1996). A sua utilização como substrato biotecnológico para a produção de enzimas poderia contribuir em muito para a redução do custo operacional da produção, bem como para a preservação do meio ambiente (KUMAR, 1999).

### **3.3.9 Urease**

A fertilidade do solo depende não apenas de fatores como a constituição física e teor de nutrientes do solo, mas também da intensidade dos processos biológicos que nele ocorre.

A urease (E.C 3.5.1.5) é uma enzima que contém níquel e catalisa a hidrólise de uréia para produzir amônia e carbamato. É o carbamato que se decompõe espontaneamente para gerar uma segunda molécula de amônia e dióxido de carbono (ANDREWS *et al.*, 1984; KARPLUS; HAUSINGER, 2001). A distribuição da urease e os fatores que a influenciam tem importância relevante em vista do uso da uréia na agricultura como fertilizante. Sua ocorrência é grande em plantas e microrganismos (particularmente as bactérias) e tem sido detectada na mucosa gástrica do homem e de alguns animais.

Sua presença em solo foi primeiro indicado por Rotini (1935), depois surgiram os trabalhos publicados por CONRAD (1942a, 1943b), evidenciando que os solos continham urease e indicando ser tal enzima responsável pela conversão do nitrogênio da uréia em amônia. Trabalhos recentes foram também realizados por alguns autores (KLOSE; TABATABAI, 1999; BENINI *et al.*, 1999).

Estudos sobre a concentração de uréia em teste de atividade da urease mostraram que a velocidade de hidrólise da uréia é aumentada com o acréscimo na concentração do substrato, até atingir uma quantidade de uréia adicionada suficiente para saturar a enzima (DOUGLAS; BREMNER, 1971; TABATABAI; BREMNER, 1972; DALAL, 1975; ZANTUA; BREMNER, 1977). Alguns autores têm demonstrado que a atividade da urease no solo não é alterada pelo nível de umidade (ZANTUA; BREMNER, 1977), enquanto outros demonstraram que esta é aumentada por um decréscimo no nível de água no solo (GOULD *et al.*, 1973)

Estudos relativos ao uso de tampão para determinar o efeito do pH na atividade da urease foram realizados por Pettit *et al.* (1976) que encontraram um pH ótimo para a urease do solo entre 6,5 e 7,0. Outros já constataram que a faixa ótima de pH do solo situa-se entre 8,8 e 9,0 (TABATABAI; BREMNER, 1972; MAY; DOUGLAS, 1976).

De forma geral, a avaliação da atividade enzimática é essencial para entender uma série de processos ocorridos no solo, inclusive para o monitoramento e entendimento das atividades poluidoras e degradadoras do solo (MARGESIN *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 2002). Neste contexto, a utilização de métodos condizentes com as condições tropicais torna-se de suma importância.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCALIZAÇÃO E ÁREA DE ESTUDO

O estudo descrito foi realizado na Província Petrolífera de Urucu, situada no município de Coari, no estado do Amazonas, às margens do rio Urucu, distante cerca de 650 km em linha reta de Manaus (Figura 2). É uma área com jazidas de petróleo e gás natural exploradas pela Petrobrás. As coordenadas geográficas da área são: 4° 53' 20" Latitude e 65° 11' 45" Longitude. O clima é classificado como tropical úmido, de acordo com a classificação de Köppen. A umidade relativa do ar é bastante elevada em toda a região, em torno de 80%.

Além do solo de Urucu, o estudo também foi realizado na comunidade rural do Brasileirinho, situada na periferia de Manaus (AM) na Zona Leste da cidade, em uma área anteriormente pertencente à SUFRAMA, na estrada do Puraquequara (Figura 3). As coordenadas geográficas da área são: 3° 01' 20" Latitude e 59° 53' 45" Longitude. O solo predominante na área é o latossolo amarelo de textura argilosa, distrófico. A comunidade destaca-se por apresentar em suas propriedades, grande número de espécies frutíferas de importância econômica para a região, tais como açaí, araçá-boi, cupuaçu, graviola, maracujá, ingá, camu-camu, pupunha, abacaxi, acerola, banana, buriti, tucumã além de espécies florestais como vinagreiro, andiroba, gergelim, cedro, mogno e jatobá.





Figura 2 - Província Petrolífera de Urucu no município de Coari, Amazonas.



Figura 3 – Imagem de Satélite mostrando a Cidade de Manaus, a Reserva Adolpho Ducke e a Comunidade do Brasileirinho.

#### 4.1.1 Áreas estudadas: jazidas, clareiras, florestas de Urucu e propriedades do Brasileirinho.

Para o presente estudo foram usadas as jazidas e clareiras apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Informações gerais sobre as amostras de solos de florestas e jazidas de Urucu e, áreas de agricultura do Brasileirinho.

Localização	Época de reflorestamento	Espécies e número de espécies introduzidas ou nativas
<b>URUCU</b>		
Floresta Nativa 05 (FN 05)	-	Inúmeras
Jazida 05 (JAZ 05)	2001	30 espécies
Floresta Nativa IMT-1 (FN IMT-1)	-	Inúmeras
Jazida IMT-1 (JAZ IMT-1)	2001	15 espécies
Jazida 12( JAZ 12)	2001	12 espécies
<b>COMUNIDADE DO BRASILEIRINHO</b>		
Propriedade 1	2001	1 espécie : Açaí ( <i>Euterpe oleracea</i> )
Propriedade 2	2001	1 espécie : Pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> )
Propriedade 3	2001	1 espécie : Tucumã ( <i>Austrocaryum aculeatum</i> )
Propriedade 4	2001	1 espécie : Buriti ( <i>Mauritia flexuosa</i> )
Propriedade 5	2001	1 espécie : Cupuaçu ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )
Propriedade 6	2001	1 espécie : Banana ( <i>Musa sp</i> )
Propriedade 7	2001	1 espécie : Acerola ( <i>Malpighia glabra</i> )
Propriedade 8	2001	1 espécie : Vinagreiro ( <i>Goupia glabra</i> )
Propriedade 9	2001	1 espécie : Gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> )
Propriedade 10	2001	1 espécie : Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> )

#### 4.2 COLETAS DE SOLO

Em fevereiro de 2008, na profundidade de 0-10cm foram coletadas seis amostras simples para formar três compostas de cada tipo de solo em três jazidas, duas florestas nativas e dez áreas agrícolas, totalizando 15 áreas e 45 amostras. Após as coletas em campo, as amostras foram embaladas em sacos plásticos

etiquetados, transportadas em caixas térmicas com gelo seco até serem guardadas em geladeira a 4°C para análises físico-químicas e microbiológicas no Laboratório de Microbiologia do Solo da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônômicas do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (CPCA/INPA). Para as análises químicas e granulométricas, as três compostas dos 15 solos foram consideradas repetições. As análises foram realizadas segundo as metodologias descritas e recomendadas pela EMBRAPA (1999) no do Laboratório Temático de Plantas e Solo (LTPS/ INPA).

#### 4.3 MEIO DE CULTURA

Para a determinação da população de microrganismos do solo utilizou-se o método de plaqueamento e diluição em série nas superfícies das placas de Petri, com meio YMA modificado contendo os seguintes nutrientes por litro: 0,2 de  $MgSO_4 \cdot H_2O$ , 0,1g de NaCl, 0,4g de extrato de levedura, 10g fonte de carbono (substituindo por amido, caseína, carboximetilcelulose, uréia, óleo de oliva ou manitol), 0,4 de  $KH_2PO_4$ , 0,1g de  $K_2HPO_4$  e 15 g de ágar. Os meios de cultura usados foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 45 minutos (VICENT, 1970). Para detecção das atividades das enzimas estudadas,

#### 4.4 AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO SOLO

A contagem do número de unidades formadoras de colônias de bactérias e fungos (UFC) foi determinada pelo método de diluição do solo e inoculação das suspensões diluídas em placas de Petri contendo os meios de cultura específicos para cada enzima. Com isso, preparou-se uma diluição decimal em série de  $10^1$  a  $10^5$  partindo de 10g de solo colocado em frascos de erlenmeyer com 95 ml de água destilada e esterilizada. De cada diluição, foi retirada uma alíquota de 1 mL por placa de Petri, sobre a qual verteu-se o meio. Para cada diluição foram feitas três repetições por placa.

Para as amostras de florestas nativas foram utilizadas as seguintes diluições:  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ . Enquanto que para as demais amostras foram utilizadas as diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$ . As diluições foram diferenciadas por se estimar que as florestas nativas tenham uma grande riqueza e quantidade de microrganismos e por isso precisaria de diluições maiores para conseguir fazer a contagem dos mesmos.

As placas foram armazenadas em estufa a 28°C. A contagem das UFC das bactérias e fungos foi realizada após dias de incubação (4, 7 ou 15 dias), conforme cada enzima estudada, usando-se o contador de microrganismos.

## 4.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM MEIO SÓLIDO

### 4.5.1 Atividade amilolítica

A suspensão de microrganismos foi testada quanto à habilidade em hidrolisar amido, no meio de cultura YMA modificado acrescido de amido de milho (Maizena) como substrato para enzima em pH 5,5. Após quatro dias de incubação a 28° C, às colônias na placa de Petri foi adicionada uma tintura de iodo para verificar o aparecimento de halo de inibição. Uma zona amarela suave ao redor da colônia em contraste com o meio azul indicou o resultado positivo para a atividade amilolítica (BUZZINI; MARTINI, 2002).

### 4.5.2 Atividade celulítica

A produção de celulase foi detectada, adicionando-se ao meio YMA modificado 10g de carboximetilcelulose L<sup>-1</sup> em pH 5,5. Depois do crescimento celular por sete dias a 28° C, a presença extracelular da enzima foi observada pelo método vermelho Congo (TEATHER; WOOD, 1982).

### 4.5.3 Atividade lipolítica

A detecção da atividade da lipase foi baseada na visualização a partir de um meio de cultura específico contendo óleo de oliva como substrato para a enzima, adicionado com corante de Rodamina B, onde a reação positiva é visualizada pela formação de um halo transparente translúcido ao redor da colônia (SAXENA *et al.*, 2003). Quando não foi possível a visualização do halo de degradação, as placas foram irradiadas com luz ultravioleta (359nm) marca BIO-RAD modelo UV Lamp

166500, seguindo a metodologia proposta em JAEGER e KOUKER (1987), no qual a observação de fluorescência ao redor da colônia caracterizou a presença da enzima.

O meio de cultura indutor para a lipase foi baseado em Sene *et al.* (2002) calibrado em pH 8,0 e contendo óleo de oliva (2,0% v/v), Tween 80 (1,0% v/v), peptona (0,3% m/v), extrato de levedura (0,2% m/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2% m/v),  $\text{MgSO}_4$  (0,1% m/v),  $\text{CaCl}_2$  (0,1% m/v), ágar (1,8% m/v), Rodamina B (0,001% m/v) com placas de Petri incubadas durante 15 dias e avaliadas a cada três dias. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 120 °C e 1,2 atm por 45 minutos. O pH foi ajustado a 8,0 após a autoclavagem.

#### **4.5.4 Atividade proteolítica**

A habilidade das bactérias em hidrolisar proteínas foi testada em meio YMA modificado contendo caseína como substrato para a enzima em pH 5,5. Para melhor visualização do halo de proteólise, após quatro dias de incubação a 28° C, as colônias nas placas foram reveladas usando-se solução de ácido acético a 5 % (STAMFORD *et al.*, 1998). Uma região transparente ao redor da colônia em contraste com a superfície opaca do meio na placa indicou atividade proteolítica.

#### **4.5.5 Atividade Ureolítica**

A atividade ureolítica foi avaliada pela metodologia proposta por CHRISTENSEN (1946), modificada com a substituição da solução de uréia a 40% por 20 g. L<sup>-1</sup> de uréia. Portanto, excetuando a uréia, a composição do meio em g .L<sup>-1</sup> foi: 1,0g de peptona, 1,0g de glicose, 5,0g de NaCl, 15 g de ágar em pH 6,8. A atividade dos microrganismos produtores de uréase foi constatada após sete dias de incubação, pela formação de um halo rosado ao redor da colônia em decorrência da mudança de pH do indicador vermelho de fenol.

#### **4.5.6 Solubilização de fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ )**

Foi utilizado o meio específico para bactérias solubilizadoras de fosfato de alumínio que continha 10g de manitol, 2g de extrato de levedura, 6g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 18g de Agar. Neste meio foi acrescentada também, uma solução contendo 5,34g de  $\text{AlCl}_3$ , para formar o precipitado de fosfato de alumínio (HARA; OLIVEIRA, 2004) e o

pH ajustado para 4,5.

Os microrganismos foram plaqueados nas placas contendo o meio específico por diluição em série  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  com o auxílio da alça de Drigalsky, estabelecendo-se três repetições para cada diluição.

O crescimento dos microrganismos foi acompanhado diariamente por um período de 15 dias, observando a presença dos halos de solubilização, determinada como uma área translúcida ao redor da colônia.

#### **4.6 Análises do material para avaliar teores de macro e micronutrientes.**

As determinações analíticas das amostras de solo foram efetuadas no Laboratório Temático de Análise de Plantas e Solos, localizado na Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), pelos métodos descritos pela EMBRAPA (1997).

Após serem secas ao ar e peneiradas, as amostras de solo foram analisadas para C, N, P, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn, Al, pH e teor de matéria orgânica. O N foi determinado por digestão sulfúrica pelo método semi-micro Kjeldahl. O P foi extraído com solução extratora HCl 0,05 1N e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,025 1N (Mehlich 1). O P assimilável foi determinado por colorimetria com vanadato-molibdato de amônio. Os elementos K, Ca, Mg, Zn, Fe, e Mn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. O Al trocável foi determinado por titulometria. O pH foi medido em água destilada (1: 2,5). E o C foi determinado por oxidação via úmida com dicromato de potássio em ácido sulfúrico.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atributos físicos e químicos

Na avaliação granulométrica, a textura predominante dos solos foi argilosa, em aproximadamente 53% dos solos na profundidade entre 0-10 cm (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultado da análise granulométrica nos solos avaliados.

Solos	Argila (%)	Areia (%)	Silte (%)	Textura (%)
<b>URUCU</b>				
FN 05 (FLORESTA NATIVA 05)	29	33	38	Arenosa
JAZ 05 (JAZIDA 05)	10	70	20	Arenosa
FN IMT-1 (FLORESTA NATIVA MT-1)	29	31	39	Arenosa
JAZ IMT-1 (JAZIDA IMT-1)	34	33	33	Arenosa
JAZ 12 (JAZIDA 12)	32	30	38	Arenosa
<b>BRASILEIRINHO</b>				
AÇAÍ ( <i>Euterpe oleracea</i> )	15	82	03	Arenosa
PUPUNHA ( <i>Bactris gasipaes</i> )	69	24	07	Argilosa
TUCUMÃ ( <i>Astrocaryum aculeatum</i> )	17	79	04	Arenosa
BURITI ( <i>Mauritia flexuosa</i> )	35	59	06	Argilosa
CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )	83	12	05	Argilosa
BANANA ( <i>Musa sp</i> )	83	11	06	Argilosa
ACEROLA ( <i>Malpighia glabra</i> )	57	19	24	Argilosa
VINAGREIRO ( <i>Goupia glabra</i> )	71	23	06	Argilosa
GERGELIM ( <i>Sesamum indicum</i> )	69	21	10	Argilosa
ANDIROBA ( <i>Carapa guianensis</i> )	62	20	18	Argilosa

A classificação dos valores Segundo COCHRANE *et al.* (1985): C= argilosa; S= arenosa; L= siltosa

Entre os 15 solos analisados, foram sete arenosos e oito argilosos (Tabela 2). A textura dos solos localizados em Urucu foi 100% arenoso, enquanto no Brasileirinho foi de 20 % arenosos e 80% argilosos. A textura argilosa apresenta propriedades e grande superfície específica como tipo dominante de carga (-/+), sendo predominantemente encontradas cargas eletricamente negativas na superfície devido à matéria orgânica (LOPES; GUILHERME, 1992). Essas cargas são importantes na interação com os microrganismos, afetando aspectos importantes da ecologia microbiana, tais como a sobrevivência, sucessão e interação entre os organismos, além de sua atividade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Entre os solos agrícolas do Brasileirinho, os cultivados com açaí e tucumã apresentaram elevada textura arenosa com 82% e 79%, respectivamente. Os solos arenosos são característicos por sua boa aeração, o que ajuda na penetração da água, no desenvolvimento de raízes de plantas, entre outros fatores.

O pH tem muita influência em vários processos e ciclos que ocorrem no solo. Na tabela 3 é possível observar os diferentes valores do pH dos solos analisados.

Tabela 3 – Valor de pH, teores de carbono, nitrogênio, relação C/N e alumínio nos solos estudados.

Solos	pH	C	N	C/N	Al <sup>3+</sup>
	---H <sub>2</sub> O---	-----g/kg solo-----			cmolc/kg
<b>URUCU</b>					
FN 05 (FLORESTA NATIVA 05)	3,6H <sup>a</sup>	30,3	2,0	15,5	3,05A
JAZ 05 (JAZIDA 05)	5,1 H <sup>a</sup>	12,3	0,8	15,4	0,43B
FN IMT-1 (FLORESTA NATIVA MT-1)	3,7 H <sup>a</sup>	39,9	2,2	18,1	4,70A
JAZ IMT-1(JAZIDA IMT-1)	4,5 H <sup>a</sup>	15,0	1,2	12,5	4,10A
JAZ 12 (JAZIDA 12)	4,3 H <sup>a</sup>	23,2	1,3	17,8	4,29A
Médias	4,2 H <sup>a</sup>	24	1,5	15,9	3,3A
<b>BRASILEIRINHO</b>					
AÇAÍ ( <i>Euterpe oleracea</i> )	4,8 H <sup>a</sup>	18,8	0,5	37,6	0,95M
PUPUNHA ( <i>Bactris gasipaes</i> )	5,0 H <sup>a</sup>	42,6	1,5	28,4	1,18M
TUCUMÃ ( <i>Astrocaryum aculeatum</i> )	4,8 H <sup>a</sup>	22,2	0,7	31,7	0,95M
BURITI ( <i>Mauritia flexuosa</i> )	5,1 H <sup>a</sup>	24,0	0,9	29,9	0,50B
CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )	4,9 H <sup>a</sup>	36,4	1,5	24,2	1,45M
BANANA ( <i>Musa sp.</i> )	4,5 H <sup>a</sup>	51,5	2,3	22,4	1,33M
ACEROLA ( <i>Malphigia glabra</i> )	6,4 M	59,4	2,4	24,7	0,22B
VINAGREIRO ( <i>Goupia glabra</i> )	5,1 H <sup>a</sup>	33,0	1,3	25,3	0,28B
GERGELIM ( <i>Sesamum indicum</i> )	5,9 M	24,5	0,8	30,6	0,80M
ANDIROBA ( <i>Carapa guianensis</i> )	4,7 H <sup>a</sup>	33,1	1,8	18,4	2,53A
Médias	5,1 H <sup>a</sup>	34,0	1,4	27,3	1,0M

A classificação dos valores segundo COCHRANE *et al.*(1985): A = alto; B = baixo; M = médio; S = satisfatório e H<sup>a</sup> = baixo.

Cada microrganismo possui um pH ótimo que lhe favorece o crescimento e o classifica de acordo com a faixa de pH. Portanto, os valores de pH indiretamente influenciam no tipo de comunidade microbiana dos diferentes solos, interferindo nos processos biológicos, principalmente nas atividades enzimáticas, que são em sua maioria, dependentes do pH. No caso dos solos de terra firme da Amazônia, com pHs que variam entre 3,7 e 4,7, os microrganismos, pelas leis evolucionistas, são tolerantes a pHs baixos, tendo em vista suas adaptações ao longo do tempo de milhões de anos em contato direto com essas condições edáficas.



A amostra FN 05 apresentou um pH 3,6 e a FN IMT-1, 3,7. Em contrapartida, observou-se nas demais amostras, pHs mais elevados. Os valores oscilaram entre 4,3 e 6,4 (Tabela 3). Os solos com pH acima de 5,3 passaram por manejos agrícolas e, possivelmente pela adição de calcário, o que pode explicar o alto teor de cálcio nesses solos (Tabela 4).

Dentre os solos estudados, vale destacar o solo com acerola, por ser o único a apresentar pH 6,4 (Tabela 3). Segundo Cochrane *et al.* (1985), na classificação de pH, os solos com gergelim (pH 5,9) e acerola (pH 6,4) são médios. Segundo Lopes e Guilherme (1992), neste pH a disponibilidade do alumínio é muito baixa conforme pode ser observado pelos 0,22 cmolc/kg de alumínio disponível no solo cultivado com acerola.

Nos solos de Urucu, teores de carbono nas florestas (30,3 g/kg da FN 05 e 39,9 g/kg de solo da FN IMT-1) foram maiores quando comparados aos das jazidas (JAZ IMT-1, 05 e 12), corroborando com pesquisas anteriores de que florestas nativas possuem maiores teores de carbono (Tabela 3).

Observou-se maior relação C/N no solo cultivado com açaí (37:1) e menor no da JAZ IMT-1 (12:1) (Tabela 3). A relação C/N próxima a 10:1 indica que há material orgânico bem decomposto e em equilíbrio e quanto mais distante de 10:1, esse material orgânico ainda não está totalmente decomposto, ou seja, ainda está em processo de decomposição, o que pode ser observado no solo cultivado com o açaí.

O efeito favorável da maior quantidade de matéria orgânica no solo deve-se à maior capacidade de retenção de água, maior disponibilidade de nutrientes, melhoria das propriedades físicas do solo e a uma maior eficiência na fertilização (PÖTTKER; BEN, 1998). Joergensen e Scheu (1999) encontraram um aumento no N total apenas na camada onde havia maior acúmulo de matéria orgânica.

Os teores de alumínio foram baixos em quatro solos (JAZ 05, buriti, acerola e vinagreiro), médios em seis (açaí, pupunha, tucumã, cupuaçu, banana) e altos em cinco (FN 05, FN IMT-1, JAZ IMT-1, JAZ 12 e andiroba). A quantidade de Al complexado é dependente do pH (HARGROVE; THOMAS, 1981) e com a elevação do pH ocorre a formação de hidróxidos de alumínio (VANCE *et al.*, 1996). Para Gismont (2009), quanto mais ácido for o solo, maior é o teor de alumínio trocável ( $Al^{+3}$ ), maior a porcentagem de saturação por alumínio, menor os teores de Ca, Mg e K, e conseqüentemente, menor a soma de bases trocáveis.

Outro fator de destaque no solo com acerola está nos altos teores de cálcio e

magnésio (20,42 cmol/kg e 1,32 cmol/kg, respectivamente) segundo COCHRANE *et al.*(1985) (Tabela 4). Um fato correlacionado com o alto teor de magnésio é o tipo de calagem (calcário dolomítico) no manejo empregado neste solo (GISMONTI, 2009). É provável que no solo cultivado com acerola foi aplicado calcário dolomítico, uma vez que o teor de Mg é bem superior ao encontrado nos solos de terra firme regionais.

Quanto aos teores de cálcio, um solo apresentou alto teor (acerola), nove apresentaram valores médios (JAZ 05, JAZ 12, pupunha, buriti, cupuaçu, banana, vinagreiro, gergelim e andiroba) e cinco, baixos (FN 05, FN IMT-1, JAZ IMT-1, açai e tucumã) segundo COCHRANE *et al.* (1985). As florestas nativas (FN 05 e FN IMT-1) apresentaram baixos teores de cálcio, comprovando que solos ácidos apresentam baixos teores de cálcio na Amazônia (Tabela 4).

Segundo a classificação de Cochrane *et al.* (1985), os teores de potássio (K<sup>+</sup>) foram baixos em oito solos (JAZ IMT-1, açai, tucumã, buriti, cupuaçu, vinagreiro, gergelim e andiroba), médio em seis (FN 05, JAZ 05, FN IMT-1, pupunha, banana e acerola) e alto em apenas um (JAZ 12).

O fósforo (P) é um macronutriente importante no crescimento das plantas e sua disponibilidade é sensível às mudanças no solo. No presente estudo, a amostra com a maior quantidade foi a do solo com acerola com 744 mg/kg e a menor foi da FN 05 com 1,7 mg/kg de solo. Isso porque foi aplicado adubo contendo fósforo neste solo. Entre os solos, a FN 05 apresentou baixo teor de fósforo, a FN IMT-1 e buriti apresentaram médios teores e todos os demais, altos teores. (COCHRANE *et al.*, 1985).

Quanto aos teores de ferro nos solos analisados, as amostras que apresentaram maiores valores foram JAZ IMT-1 e buriti (310 mg /kg) e o menor foi da amostra com acerola (107mg /kg de solo), porém segundo COCHRANE *et al.* (1985) todos têm altos teores de ferro.

Quanto aos teores de zinco, nove solos tiveram teores satisfatórios (FN IMT-1, JAZ 12, buriti, cupuaçu, banana, acerola, vinagreiro, gergelim e andiroba) e seis teores baixos (COCHRANE *et al.*, 1985). Em destaque o solo com acerola apresentou o maior teor (20,1 mg/kg) e a amostra JAZ 05 o menor (1,7 mg/kg de solo). Entretanto, quanto ao manganês, os teores foram todos baixos segundo COCHRANE *et al.*, 1985, sendo o maior deles, no solo com acerola (1,32 mg/kg de solo).

Tabela 4 – Teores de macro e micronutrientes e de fósforo encontrados nos solos de Urucu e do Brasileirinho.

	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	P	Fe	Zn	Mn
	----- cmolc/kg solo -----			----- mg/kg solo -----			
<b>URUCU</b>							
FN 05 (FLORESTA NATIVA 05)	0,05B	0,10B	0,29M	1,7B	228A	1,2B	0,10B
JAZ 05 (JAZIDA 05)	1,31M	0,14B	0,17M	12,4A	185A	0,5B	0,14B
FN IMT-1 (FLORESTA NATIVA MT-1)	0,13B	0,18B	0,16M	6,4M	139A	2,0S	0,18B
JAZ IMT-1(JAZIDA IMT-1)	0,10B	0,10B	0,06K <sup>a</sup>	7,5A	310A	0,8B	0,10B
JAZ 12 (JAZIDA 12)	1,40M	0,11B	0,49A	25,8A	185A	2,7S	0,14B
<b>BRASILEIRINHO</b>							
AÇÁÍ ( <i>Euterpe oleracea</i> )	0,18B	0,06B	0,04K <sup>a</sup>	7,2A	123A	0,7B	0,06B
PUPUNHA ( <i>Bactris gasipaes</i> )	0,47M	0,26M	0,17M	10,6A	175A	1,1B	0,26B
TUCUMÃ ( <i>Austrocaryum aculeatum</i> )	0,11B	0,06B	0,03K <sup>a</sup>	19,5A	211A	1,1B	0,26B
BURITI ( <i>Mauritia flexuosa</i> )	0,41M	0,15B	0,11K <sup>a</sup>	5,7M	310A	1,9S	0,15B
CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )	0,88M	0,15B	0,07K <sup>a</sup>	8,6A	197A	3,3S	0,15B
BANANA ( <i>Musa sp</i> )	0,62M	0,37M	0,17M	10,9A	160A	1,6S	0,37B
ACEROLA ( <i>Malphigia glabra</i> )	20,42A	1,32A	0,17M	744,0A	107A	20,1S	1,32B
VINAGREIRO ( <i>Goupia glabra</i> )	0,94M	0,24M	0,14K <sup>a</sup>	11,2A	269A	2,2S	0,24B
GERGELIM ( <i>Sesamum indicum</i> )	2,82M	0,21M	0,09K <sup>a</sup>	468,5A	173A	18,2S	0,21B
ANDIROBA ( <i>Carapa guianensis</i> )	0,44M	0,13B	0,10K <sup>a</sup>	63,4A	223A	1,6S	0,13B

A classificação dos valores segundo COCHRANE *et al.* (1985): A = alto; B = baixo; M = médio; S = satisfatório; K<sup>a</sup> = baixo.

## 5.2 ATRIBUTOS BIOLÓGICOS

Considerando o mês de fevereiro como período de avaliação quanto à população de bactérias e fungos, representada por unidades formadoras de colônias (UFC), foi observada uma maior concentração de bactérias amilolíticas em relação aos fungos amilolíticos na maioria dos solos estudados (Tabela 5).

### 5.2.1 Atividade amilolítica

Na amostra FN 05 (Floresta Nativa) foram quantificados  $183,3 \times 10^3$  microrganismos. Desse total,  $175 \times 10^3$  foram bactérias e  $8,3 \times 10^3$  fungos. Entre a população de bactérias, apenas 2% ( $3,3 \times 10^3$ ) apresentaram atividades para amilase. Por outro lado, entre a população fúngica demonstrou que 8,4% ( $0,7 \times 10^3$ ) foram amilolíticos (Tabela 5).

Tabela 5 - População de bactérias e fungos cultivados em meio de cultura contendo amido como fonte de carbono.

SOLOS	Bactérias amilolíticas	Bactérias totais	Fungos amilolíticos	Fungos totais	Microrganismos totais
URUCU					
	----- $10^3 \text{ g}^{-1}$ de solo *-----				
FN 05 (FLORESTA NATIVA )	3,3	175	0,7	8,3	183,3
JAZ 05 (JAZIDA 05)	14,0	214	3,3	14,0	227,7
FN IMT-1 (FLORESTA NATIVA)	0,7	117	6,6	46,7	163,7
JAZ IMT-1(JAZIDA IMT-1)	14,3	212	0,3	6,0	218,0
JAZ 12 (JAZIDA 12)	22,7	193	1,7	5,3	198,3
Médias	11,0	132,0	2,52	16,06	198,0
BRASILEIRINHO					
AÇAI ( <i>Euterpe oleracea</i> )	30,0	30	<0,1	1,3	301,3
PUPUNHA ( <i>Bactris gasipaes</i> )	30,0	304	6,0	15,0	319,0
TUCUMÃ ( <i>Austrocaryum aculeatum</i> )	30,0	301	10,0	10,0	311,0
BURITI ( <i>Mauritia flexuosa</i> )	30,0	306	13,3	13,3	319,3
CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )	<0,1	272	2,0	2,3	274,3
BANANA ( <i>Musa sp.</i> )	<0,1	30	30,0	30,0	60,0
ACEROLA ( <i>Malpighia glabra</i> )	3,0	272	<0,1	1,0	273,0
VINAGREIRO ( <i>Goupia glabra</i> )	23,0	285	<0,1	11,6	296,6
GERGELIM ( <i>Sesamum indicum</i> )	263,0	267	<0,1	6,7	273,7
ANDIROBA ( <i>Carapa guianensis</i> )	0,3	241	<0,1	<0,1	241,1
Médias	40	256	6,18	9,13	265

\* Médias de três repetições.

Na amostra JAZ 05 (jazida adjacente à floresta FN 05) ocorreram  $227,7 \times 10^3$  microrganismos. Desse total, a população de bactérias representou 94% ( $214 \times 10^3$ ), enquanto que a população de fungos foi de 6% ( $14 \times 10^3$  UFC). As colônias de bactérias amilolíticas foram de  $14 \times 10^3$  por grama de solo, correspondendo a 6,5 % do total de bactérias, enquanto que  $3,3 \times 10^3$  dos fungos foram amilolíticos,

correspondendo a 23% do total de fungos. Considerando que os solos de florestas nativas não sofreram nenhum desequilíbrio, pode-se inferir que o tratamento de recuperação da JAZ 05 vem favorecendo a população de bactérias amilolíticas.

Em outra amostra de floresta (FN IMT-1), a população de microrganismos foi de  $163,7 \times 10^3$  UFC/g de solo. Entre essa população,  $117 \times 10^3$  foram de bactérias e  $46,7 \times 10^3$  de fungos. Na população de bactérias, apenas  $0,7 \times 10^3$  apresentaram atividade amilolítica, enquanto que na população de fungos,  $6,6 \times 10^3$  mostraram a mesma atividade.

No solo da JAZ IMT-1, a população de microrganismos totais foi de  $218 \times 10^3$  UFC/g de solo. Quanto aos que apresentam atividade amilolítica, a população de bactérias foi de  $14,3 \times 10^3$  e a de fungos de  $0,6 \times 10^3$  UFC/ g de solo.

O solo JAZ 12 apresentou  $198,3 \times 10^3$  microrganismos, onde  $193 \times 10^3$  UFC/ g de solo foram de bactérias e  $5,3 \times 10^3$  de fungos. Entre essa população de bactérias, apenas  $22,7 \times 10^3$  apresentaram atividade para amilase. Por outro lado, entre a população total de fungos ( $5,3 \times 10^3$  UFC/ g de solo), somente  $1,2 \times 10^3$  UFC/ g de solo apresentaram atividade para amilase.

Nos solos de Urucu, os valores médios indicaram haver  $198,0 \times 10^3$  microrganismos por grama de solo, sendo  $132 \times 10^3$  bactérias e  $16 \times 10^3$  fungos. A população média de bactérias amilolíticas foi de  $11 \times 10^3$  UFC e a de fungos amilolíticos,  $2,5 \times 10^3$  UFC/ g de solo.

No Brasileirinho, o solo com tucumã apresentou  $306 \times 10^3$  microrganismos. Desse total,  $300 \times 10^3$  foram bactérias e  $6 \times 10^3$  fungos. Entre a população de bactérias, apenas 10% ( $30 \times 10^3$ ) apresentaram atividades para amilase. Por outro lado, a população de fungos foi toda amilolítica ( $10 \times 10^3$  UFC/ g de solo).

O solo com pupunha e o com buriti apresentaram as maiores populações de microrganismos totais ( $319 \times 10^3$  e  $319,3 \times 10^3$ , respectivamente). Já o solo rizosférico da banana apresentou a menor população de microrganismos totais ( $60 \times 10^3$  UFC), uma população de bactérias amilolíticas inferior a  $0,1 \times 10^3$  UFC/ g de solo e a maior população amilolítica de fungos ( $30 \times 10^3$  UFC/ g de solo).

As menores populações de fungos amilolíticos ocorreram nos solos com açaí, acerola, banana, vinagreiro, gergelim e andiroba ( $<0,1 \times 10^3$  UFC/ g de solo). Possivelmente, a disponibilidade ou a qualidade de substratos orgânicos nesses solos não favoreceu o crescimento desses tipos de fungos.

Com exceção do solo com bananeira, no qual a população de bactérias foi

igual à de fungos, predominou nas demais amostras, a população de bactérias, bem superior às de fungos.

Todos os solos estudados foram inoculados em meio de cultura (YMA modificado contendo amido de milho) em condições de pH 5,5. Os resultados encontrados na Tabela 5 não corroboram com alguns trabalhos, entre os quais, Moreira e Siqueira (2002), que com base em várias referências, mencionam que fungos são mais adaptados a pH menores que 5,0 e bactérias, a valores entre 6 e 8. De acordo com Brandão (1992), os fungos são encontrados predominantemente em solos ácidos, onde sofrem menor competição; no entanto, esses organismos podem ser encontrados em solos com pH variando de 3,0 a 9,0 – o valor de pH ótimo é variável com a espécie. Moreira e Siqueira (2002) salientam a existência de exceções, que devem ser consideradas para evitar generalizações errôneas. Para Calbrix *et al.* (2005), a heterogeneidade espacial e temporal das comunidades microbianas no solo torna o estudo de biodiversidade microbiana difícil.

### 5.2.2 Atividade proteolítica

A análise feita para detectar populações de bactérias e fungos proteolíticos capazes de utilizar a caseína como substrato revelou a presença desses microrganismos (Tabela 6).

Na amostra FN 05 (Floresta Nativa) foram quantificados  $647 \times 10^3$  microrganismos. Desse total,  $467 \times 10^3$  foram bactérias e  $180 \times 10^3$  fungos. Entre a população de bactérias, 64% ( $300 \times 10^3$  UFC) apresentaram atividades para protease. No entanto, a população fúngica mostrou-se 100% proteolítica ( $180 \times 10^3$  UFC) (Tabela 6).

Já no solo da JAZ 05 foram encontrados  $18,3 \times 10^3$  microrganismos. Desse total, a população de bactérias representou 98% ( $18 \times 10^3$ ), enquanto que a de fungos foi de 2% ( $0,3 \times 10^3$  UFC). As colônias de bactérias amilolíticas foram de  $11 \times 10^3$  por grama de solo, correspondendo a 61 % do total de bactérias, enquanto que  $0,3 \times 10^3$  dos fungos foram amilolíticos, correspondendo a 100% do total de fungos.

Contudo, nos solos da JAZ 05 a demanda e a qualidade dos substratos foram poucas, pois houve retirada de matéria orgânica, cobertura vegetal superficial, microfauna e flora da área o que pode ter afetado na quantidade de microrganismos totais.

Nos solos do Brasileirinho, em relação aos microrganismos totais, o número

na rizosfera da banana foi maior ( $624 \times 10^3$  UFC) (Tabela 6). A qualidade e a quantidade de exsudatos radiculares, bem como a morfologia radicular, variam entre as espécies vegetais, e isso tem grande influência sobre as propriedades microbiológicas da rizosfera (BINET *et al.*, 2000b; LANDI *et al.*, 2006), as quais podem afetar a taxa de degradação dos compostos contaminantes no solo, já que a menor quantidade ocorreu em uma jazida petrolífera (JAZ 05). Tais observações sugerem uma relação íntima bactéria-plantas que podem estimular a população de microrganismos proteolíticos, através da exsudação de metabólitos.

Tabela 6 - População de bactérias e fungos cultivados em meio de cultura contendo caseína como fonte de carbono.

Solos	Bactérias proteolíticas	Bactérias totais	Fungos proteolíticos	Fungos Totais	Microrganismos totais
	----- $10^3 \cdot g^{-1}$ de solo * -----				
<b>URUCU</b>					
FN 05 (FLORESTA NATIVA)	300	467	180,0	180,0	647,0
JAZ 05 (JAZIDA 05)	11	18	0,3	0,3	18,3
FN IMT-1 (FLORESTA NATIVA)	53	53	20,0	20,0	73,0
JAZ IMT-1(JAZIDA IMT-1)	15	53	<0,1	<0,1	53,0
JAZ 12 (JAZIDA 12)	32	71	0,3	0,3	71,3
<b>Média</b>	<b>82</b>	<b>132</b>	<b>40,0</b>	<b>40,0</b>	<b>172,0</b>
<b>BRASILEIRINHO</b>					
AÇAÍ ( <i>Euterpe oleracea</i> )	28	28	1,47	163,0	191,0
PUPUNHA ( <i>Bactris gasipaes</i> )	302	302	<0,1	25,0	327,0
TUCUMÃ ( <i>Astocaryum aculeatum</i> )	300	300	23,7	23,7	323,7
BURITI ( <i>Mauritia balbisiana</i> )	301	301	18,7	18,7	319,7
CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )	253	253	2,0	2,0	255,0
BANANA ( <i>Musa balbisiana</i> )	300	300	304,0	324,0	624,0
ACEROLA ( <i>Malpighia glabra</i> )	265	265	4,0	40,0	305,0
VINAGREIRO ( <i>Goupia glabra</i> )	241	241	6,7	6,7	247,7
GERGELIM ( <i>Sesamum indicum</i> )	300	300	270,0	287,0	587,0
ANDIROBA ( <i>Carapa guianensis</i> )	207	207	1,0	5,0	212,0
<b>Médias</b>	<b>249</b>	<b>249</b>	<b>123,0</b>	<b>89,0</b>	<b>339,0</b>

Entretanto, foi no solo com pupunha que a população de bactérias proteolíticas foi a maior ( $302 \times 10^3$  UFC/ g de solo). Os solos com pupunha, tucumã, buriti, banana e gergelim apresentaram números aproximados de bactérias

proteolíticas quando comparados com a FN 05 (Floresta Nativa), indicando um provável equilíbrio na população proteolítica bacteriana nestes solos, pois os mesmos de florestas nativas encontram-se em equilíbrio biológico.

O fato das bactérias proteolíticas ocorrerem em maior número em relação aos fungos proteolíticos poderia ser explicado por se tratar de amostras de solo da rizosfera onde predominam bactérias (Tabela 6). Além disso, a população de bactérias é influenciada pela presença da cobertura vegetal através da produção de exsudatos radiculares. Os exsudatos se difundem até distâncias distintas através do meio adjacente, representando um nicho bastante atraente para os microrganismos, onde os mais diversos tipos de interações podem ser observados entre estes e as plantas, assim como entre os diversos membros da microbiota (CARDOSO; FREITAS, 1992).

Entre a comunidade fúngica proteolítica, a maior contagem de colônias foi no solo com banana ( $304 \times 10^3$  UFC) e a menor no solo com pupunha ( $< 0,1 \times 10^3$  UFC/g de solo) (Tabela 6). As menores populações encontradas nas amostras estudadas podem estar relacionadas com a qualidade do substrato, uma vez que a biomassa microbiana é controlada não só pelo teor de matéria orgânica acrescentada ao solo, mas também pelo teor de N desses resíduos (WARDLE; HUNGRIA, 1994).

### 5.2.3 Atividade celulítica

Nos solos de Urucu, a amostra FN 05 (Floresta Nativa) foram quantificados  $1976,7 \times 10^3$  microrganismos. Desse total,  $1920 \times 10^3$  foram bactérias e  $56,7 \times 10^3$  fungos. Entre a população de bactérias, 13% ( $257 \times 10^3$  UFC) apresentaram atividades de celulase. No entanto, a população fúngica demonstrou-se 41% celulítica ( $23,3 \times 10^3$  UFC) (Tabela 7). No solo da JAZ 05 observou-se menores populações quando comparadas com o solo da FN 05.

Na floresta nativa IMT-1 (FN IMT-1), a população de microrganismos foi de  $1753 \times 10^3$  UFC/g de solo, divididos em  $1733 \times 10^3$  bactérias e  $20 \times 10^3$  fungos. Comparando esta última com a JAZ IMT-1, observou-se que todas as populações foram inferiores ( $49 \times 10^3$  microrganismos sendo  $47 \times 10^3$  bactérias e  $2 \times 10^3$  UFC/g de solo).

O solo com o maior número entre todas as populações analisadas foi o da JAZ 12 (Tabela 7). Segundo Pereira *et al.*, (1996), a presença das raízes e as



modificações físicas e químicas que elas produzem criam um ecossistema especializado, onde o crescimento das populações na comunidade microbiana pode ser beneficiado ou inibido.

Tabela 7 - População de bactérias e fungos cultivados em meio de cultura contendo carboximetilcelulase (CMC) como fonte de carbono.

Solos	Bactérias celulíticas	Bactérias totais	Fungos celulíticos	Fungos totais	Microrganismos totais
<b>URUCU</b>					
-----10 <sup>3</sup> . g <sup>-1</sup> de solo* -----					
FN 05 (FLORESTA NATIVA)	257,0	1920,0	23,3	56,7	1976,7
JAZ 05 (JAZIDA 05)	21,0	33,0	1,0	1,4	34,4
FN IMT-1 (FLORESTA NATIVA)	223,3	1733,0	20,0	20,0	1753,0
JAZ IMT-1(JAZIDA IMT-1)	18,7	47,0	2,0	2,0	49,0
JAZ 12 (JAZIDA 12)	4600,0	9667,0	266,6	1333,0	11000,0
<b>Média</b>	1023	260	62,58	282	2962
<b>BRASILEIRINHO</b>					
AÇAÍ ( <i>Euterpe oleracea</i> )	<0,1	89,0	<0,1	13,0	102,0
PUPUNHA ( <i>Bactris gasipaes</i> )	<0,1	65,0	<0,1	23,3	88,3
TUCUMÃ ( <i>Austrocaryum aculeatum</i> )	<0,1	120,0	<0,1	9,3	129,3
BURITI ( <i>Mauritia flexuosa</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cupuaçu ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
BANANA ( <i>Musa balbisiana</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
ACEROLA ( <i>Malpighia glabra</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
VINAGREIRO ( <i>Goupia glabra</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
GERGELIM ( <i>Sesamum indicum</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
ANDIROBA ( <i>Carapa guianensis</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Média</b>	0,1	27,97	0,1	133,3	32,03

\* Média de três repetições.

Os solos do ramal do Brasileirinho receberam intensa interferência antrópica, como adubação e calagem de solo e não foi possível detectar a ocorrência de microrganismos celulíticos usando esta metodologia (CHRISTENSEN *et al.*, 1946) (Tabela 7). Provavelmente, solos rizosféricos com pouquíssima diversidade de substratos não favorecem a ocorrência de microrganismos produtores de celulases. Mesmo sem a ocorrência de microrganismos celulíticos, nesses solos, notou-se a presença

de outros microrganismos nos solos com açaí ( $102 \times 10^3$ ) pupunha ( $88,3 \times 10^3$ ) e tucumã ( $129 \times 10^3$  UFC/g de solo) (Tabela 7).

#### 5.2.4 Atividade ureolítica

Com relação aos microrganismos ureolíticos (Tabela 8), a maior população de microrganismos totais em meio de cultura contendo uréia como fonte de carbono foi no solo com vinagreiro ( $7233 \times 10^3$  UFC/g de solo) e a menor foi no com cupuaçu ( $6 \times 10^3$  UFC/g de solo).

Já no solo com vinagreiro, a população de bactérias totais representou 75% dos microrganismos totais presentes neste solo e dentre as bactéria totais, a população de bactérias ureolíticas foi de 100% neste solo. Mesmo no solo com cupuaçu, o de menor população de microrganismos totais, as bactérias totais representaram 67% dos microrganismos totais e entre essa porcentagem, a ocorrência de bactérias ureolíticas foi de 92% (Tabela 8).

Na amostra FN 05, as bactérias totais representaram 68% dos microrganismos, enquanto a população de bactérias ureolíticas representou 42% das bactérias. Já na FN IMT-1, as bactérias representaram 71% dos microrganismos, onde 16% dessas bactérias foram ureolíticas.

Quanto à distribuição da população de microrganismos produtores de urease, em todos os solos analisados verificou-se a capacidade de produção de urease (Tabela 8). Isso sugere haver uréia disponível nos solos de Urucu e Brasileirinho para a ocorrência desses microrganismos nos solos rizosféricos. Segundo Estermann e McLaren (1961), a distribuição de urease no solo pode ser atribuída aos organismos do solo. A uréia pode ser hidrolisada por actinomicetos, bactérias e fungos, sendo as bactérias o grupo mais importante (LLOYD; SHEAFFE, 1973).

Observou-se que o solo das JAZ 12 apresentou a menor população de bactérias ureolíticas. E a maior população ocorreu no solo da JAZ IMT-1. Na comunidade do Brasileirinho, a população de bactérias ureolíticas foi maior no solo com vinagreiro, com  $5433 \times 10^3$  UFC/ g de solo e a menor no cupuaçu. Quanto à população de fungos ureolíticos, o solo com gergelim apresentou a maior contagem, bem como, entre a população total de microrganismos.

Tabela 8 - População de bactérias e fungos cultivados em meio de cultura contendo uréia como fonte de carbono.

Solos	Bactérias ureolíticas	Bactérias totais	Fungos ureolíticos	Fungos totais	Microorganismos totais
<b>URUCU</b>					
	----- 10 <sup>3</sup> . g <sup>-1</sup> de solo *-----				
FN 05 (FLORESTA NATIVA)	96,6	230	60,0	107,0	337,0
JAZ 05 (JAZIDA 05)	456,7	1010	700,0	1767,0	2777,0
FN IMT-1 (FLORESTA NATIVA)	40,0	243	6,7	100,0	343,0
JAZ IMT-1(JAZIDA IMT-1)	2626,0	2626	1433,3	1433,3	4059,3
JAZ 12 (JAZIDA 12)	1,0	2	0,3	7,7	9,7
<b>Médias</b>	644	822	440	682	1505
<b>BRASILEIRINHO</b>					
AÇAÍ ( <i>Euterpe oleracea</i> )	9,7	20	3,3	3,7	23,7
PUPUNHA ( <i>Bactris gasipaes</i> )	7,0	10	3,0	3,0	13,0
TUCUMÃ ( <i>Austrocaryum aculeatum</i> )	12,7	13	6,0	6,0	19,0
BURITI ( <i>Mauritia flexuosa</i> )	7,0	7	0,3	0,3	7,3
CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )	3,7	4	2,0	2,0	6,0
BANANA ( <i>Musa sp</i> )	20,7	21	3,0	3,0	24,0
ACEROLA ( <i>Malphigia glabra</i> )	100,0	101	3,0	4,0	105,0
VINAGREIRO ( <i>Goupia glabra</i> )	5433,0	5433	1800,0	1800,0	7233,0
GERGELIM ( <i>Sesamum indicum</i> )	3266,7	3267	1466,6	1466,6	4733,6
ANDIROBA ( <i>Carapa guianensis</i> )	733,3	1100	300,0	766,0	1866,0
<b>Médias</b>	959	997	358	405	1403

\* Média de três repetições

### 5.2.5 Solubilização de fosfato de alumínio

Quanto aos microrganismos solubilizadores de fosfatos, nenhum dos solos rizosféricos analisados apresentou ocorrência de população de microrganismos com potencial para esse fim na diluição usada (Tabela 9).

Tabela 9 - População de bactérias e fungos cultivados em meio de cultura YMA modificada contendo fosfato de alumínio.

Solos	Bactérias Solubilizadoras	Bactérias totais	Fungos solubilizadores	Fungos totais	Microorganismos totais
<b>URUCU</b>					
	----- 10 <sup>3</sup> . g <sup>-1</sup> de solo* -----				
FN 05 (FLORESTA NATIVA)	<0,1	<0,1	<0,1	1,3	1,3
JAZ 05 (JAZIDA 05)	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	0,6
FN IMT-1 (FLORESTA NATIVA)	<0,1	<0,1	<0,1	1,0	1,0
JAZ IMT-1 (JAZIDA IMT-1)	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	0,6
JAZ 12 (JAZIDA 12)	<0,1	<0,1	<0,1	0,3	0,3
<b>Médias</b>	0,1	0,1	0,1	0,76	0,76
<b>BRASILEIRINHO</b>					
AÇÁI ( <i>Euterpe oleracea.</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	1,0	1,0
PUPUNHA ( <i>Bactris gasipaes</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	0,6
TUCUMÃ ( <i>Austrocaryum aculeatum</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	0,6
BURITI ( <i>Mauritia flexuosa</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	0,3	0,3
BANANA ( <i>Musa sp.</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	0,3	0,3
ACEROLA ( <i>Malpighia glabra</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	0,6
VINAGREIRO ( <i>Goupia glabra</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	0,6
GERGELIM ( <i>Sesamum indicum</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	0,6
ANDIROBA ( <i>Carapa guianensis</i> )	<0,1	<0,1	<0,1	1,0	1,0
Média	0,1	0,1	0,1	0,57	0,57
<b>Médias</b>	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	0,6

\* Média de três repetições

Provavelmente, esses resultados se devem ao fato de solos rizosféricos não favorecerem a ocorrência de microrganismos produtores de fosfatase, conforme já observado por MILLER *et al.* (1989). O aparecimento dessa enzima é atribuído principalmente às raízes de plantas (ESTERMANN; McLAREN, 1961). A literatura tem apontado o efeito das plantas na variação da contagem de bactérias e grupos fisiológicos bacterianos na rizosfera e solos não rizosféricos de plantas (MILLER *et al.*, 1989). Tem sido assinalado que essa variação está relacionada à secreção de compostos químicos na rizosfera e à idade das plantas (MERCKX *et al.*, 1987). Mais de 2.000 culturas foram isoladas de 68 solos em meios enriquecidos, observando-se que a atividade de fitase extracelular foi encontrada nos fungos, mas não em

bactérias e leveduras (SHIEH; WARE, 1968).

### 5.2.6 Atividade lipolítica

Os microrganismos totais foram muito bem representados em meio contendo como única fonte de carbono o óleo de oliva. Porém, as bactérias ocorreram em número menor que os fungos lipolíticos. A oferta de diferentes tipos de fonte de carbono poderá ter sido fator limitante no crescimento de bactérias e favorecendo a população lipolítica de fungos (Tabela 10).

Tabela 10 - População de bactérias e fungos totais cultivados em meio de cultura contendo azeite de oliva como fonte de carbono.

Solos I	Bactérias lipolíticas	Bactérias totais	Fungos lipolíticos	Fungos totais	Microrganismos totais
<b>URUCU</b>					
	----- 10 <sup>3</sup> . g <sup>-1</sup> de solo* -----				
FN 05 (FLORESTA NATIVA )	1	177	3,3	174	351
JAZ 05 (JAZIDA 05)	3,4	8	<0,1	5	13
FN IMT-1 (FLORESTA NATIVA )	3,4	120	<0,1	110	230
JAZ IMT-1(JAZIDA IMT-1)	<1,0	5	<0,1	3	8
JAZ 12 (JAZIDA 12)	<1,0	1	0,6	2	3
<b>Médias</b>	<b>1,96</b>	<b>62,2</b>	<b>0,84</b>	<b>58,5</b>	<b>121</b>
<b>BRASILEIRINHO</b>					
AÇÁI ( <i>Euterpe oleracea</i> )	66,7	467	200	634	1101
PUPUNHA ( <i>Bactris gasipaes</i> )	<0,1	66	0,6	14	80
TUCUMÃ ( <i>Austrocaryum aculeatum</i> )	<0,1	500	4,3	3500	4000
BURITI ( <i>Mauritia flexuosa</i> )	3830	3930	3843,6	3931	7861
CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )	1600	1706	1519	1600	3306
BANANA ( <i>Musa sp.</i> )	<0,1	250	<0,1	210	460
ACEROLA ( <i>Malphigia glabra</i> )	166,7	247	1	300	547
VINAGREIRO ( <i>Goupia glabra</i> )	<0,1	400	<0,1	504	904
GERGELIM ( <i>Sesamum indicum</i> )	<0,1	467	<0,1	567	1034
ANDIROBA ( <i>Carapa guianensis</i> )	<0,1	418	<0,1	477	895
<b>Médias</b>	<b>566</b>	<b>845</b>	<b>556</b>	<b>1173</b>	<b>2018</b>

\* Média de três repetições

Com relação às bactérias lipolíticas, em populações superiores a  $0,1 \times 10^3$  UFC, observou-se que a maior foi a amostra com buriti ( $3830 \times 10^3$  UFC) e a menor foi a FN 05 ( $1 \times 10^3$  UFC/ g de solo) (Tabela 10).

Não foi possível detectar, na diluição usada, colônias de bactérias lipolíticas nos solos de JAZ IMT-1, JAZ 12, pupunha, tucumã, banana, vinagreiro, gergelim e andiroba. Entre os fungos lipolíticos, o buriti apresentou o maior número e não se detectou a presença de microrganismos capazes de produzir lipase nos solos das JAZ 05, FN IMT-1, JAZ IMT-1, banana, vinagreiro, gergelim e andiroba.

## 6. CONCLUSÕES

- Nos solos de florestas nativas de Urucu, como também em solos impactados pela exploração de petróleo de Urucu e em solos cultivados com espécies de importância ecológica do Brasileirinho ocorrem microrganismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico.
- Houve a produção das enzimas amilase, protease, celulase, urease e lipase por microrganismos isolados nesses solos.
- Os microrganismos produtores de fosfatase alcalina não foram detectados pela metodologia (diluição) adotada nos solos analisados.
- Houve a presença de microrganismos produtores de urease em todos os solos analisados.
- Os solos localizados no ramal do Brasileirinho não apresentaram população de microrganismos celulíticos na diluição de  $10^3$  da metodologia adotada.
- A amostra de floresta natural de Urucu denominada FN 05 apresentou a maior diversidade de enzimas, confirmando que não se encontra impactada, pois houve ocorrência de microrganismos produtores das enzimas amilase, protease, celulase, urease e lipase.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, G.; HUITRON, C. Enzima Microbiol. **Revista Technol.** v. 9, n.41, 1986.

ALFAIA, S. S; OLIVEIRA, L.A. Pedologia e fertilidade dos solos da Amazônia. In: Duas décadas de contribuições do INPA à Pesquisa Agronômica no trópico úmido. **Act. Amaz.**, Manaus: INPA, p.179-191, 1997.

ALTAMIRANO, M.M.; BLACKBURN, J.M.; AGUAYO, C.; FERSHT, A.R. Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold. **Nature**, v. 403, n. 6.770, p. 617-622, 2000.

ALVIM, P.T. Perspectivas na produção agrícola na região Amazônica. **Interciência**, v. 3 p. 243-245, 1978.

AMANN, C. I.; FRANZIER, M. L.; WANG, W. DNA pooling in mutation detection with reference to sequence analys. **Am J Hum Genet.**, v. 66, p. 1689-92, 1995.

ANDRESON, J.M; INGRAN, J.S.I. 1993. **Tropical Soil Biology and Fertility: a handbook of methods.** Wallingford, UK, CAB International. p.221, 2003.

ANDREWS, R. K.; BLAKELEY, R. L; ZERNER, B. **Urea and Urease.** In: Advances in Inorganic Biochemistry, Eichhorn, G.L.; Marzilli, L.G. (eds.) v.6, Elsevier, Amsterdam, p. 245–283, 1984

ANTOUN, M. D; RAMOS, Z.; VAZQUES, J; OQUENDO, I.; PROCTOR, G. R.; GERENA, L.; FRANZBLAU, S. G. Evaluation of the flora of Puerto Rico for in vitro anti-plasmodial and antimycobacterial activities. **Phytother Res.** v.15, p. 638-624, 2001.

AOKI, K. et al. Anaerobic synthesis of extracellular proteases by the soil bacterium *Bacillus* sp. AM-23: purification and characterization of the enzymes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.1377-1382, 1995.

ASSAD, A. L. D. Biodiversidade e instituciolização e programas governamentais no Brasil. Campinas, SP. **Tese de doutorado**, p.200, 2000.

ATLAS, R. M. Diversity of microbial communities. In: MARSHALL, K. C (Ed.). **Advances in Microbial Ecology**, New York, v.7, p. 1-47, 1984.

AUTERINEN, ANNA-LIISA. **White Biotechnology and Modern Textile Processing** **Textile World**, p. 40-44, 2006.

BARNS, S.M.; FUNDYGA, R.E.; JEFFRIES, M. W., PACE, N. R. Remarkable archaeal diversity detect in a Yellowstone National Park hot spring environment. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, p.1609- 13, 1994.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.10, p. 2043-2050, 2000.



- BAYER, E.A. ;LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource?. **Biodegradation** v.3, p.171-188, 1992.
- BENLLOCH, S.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. **Systematic and Applied Microbiology**. v.18, p. 574-581, 1995.
- BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W.R.; WILSON, K.S.; MILLETI, S.; CIURLI, S.; MORGANI, S. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of native and inhibited enzyme from *Bassillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. **Struct. Fold. Design**. v 7, p.205-216, 1999.
- BERTON, R.S.; PRATT, P.F.; FRANKENBERGER, W.T. Phosphorus availability in soils amended with organic materials, estimated by three chemical methods and two enzyme activities. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.21, n.4, p.617-624, 1997.
- BIELY, P. Microbial Xylanolytic Systems. **Trends in Biotechnology**, v.3, p. 286–295, 1985.
- BINET, P.H.; PORTAL, J.M.; LEYVAL, C. Dissipation of 3-6- ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. **Soil Biol. Biochem.**, v.32, 2011-2017, 2000b.
- BIRBOIM, H. C; DOLY, J.A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**, v.7, p.1513-1523, 1979.
- BOLLAND, M.D.A.; GILKES, R.J. Long-term residual value of North Carolina and Queensland rock phosphates compared with triple superphosphate. **Fertilizer Research**, Dordrecht, v.41, n.2, p.151-158,1995.
- BORNEMANN, J. Culture-independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli. **Appl Environ Microbiol** **65**, p. 3398-400, 1999.
- BORNEMANN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soil from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Appl Environ Microbiol** **65**, p. 3398-400, 1999.
- BRITSCHGI, T.B., GIOVANNIS. J. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton by rRNA gene cloning and sequencing. **Appl Environ Microbiol** **57**, p. 1707-13, 1991.
- BRUGGEN, A.H.C.; SEMENOV, A.M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.15, n.1, p. 13-24, 2000.
- BRZOZOWSKI, A.M.; LAWSON, D.M.; TURKENBURG, J.P.; BISGAARD-FRANTZEN, H.; SVENDSEN, A.; BORCHERT, T.V.; DAUTER, Z.; ILSON, K.S.; DAVIES, G. **J. Biochemistry**, v.39, p. 9099-9107, 2000

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from topical environments. **J. Appl. Microbiol.**, 93, p.1020-1025, 2002.

CALL, H.P.; MÜCKE, I. Minireview: history, overview and applications of mediated ligninolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym-Process). **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 53, p. 163-202. 1997.

CALBRIX, R.; LAVAL, K.; BARRAY, S. Analysis of the potential functional diversity of the bacterial community in soil: A reproducible procedure using sole-carbon-source utilization profiles. **Eur. J. Soil Biol.**, v. 41, p.11-20, 2005.

CAMPBELL, R.; GREAVES, M.P. **Anatomy and community structure of the rhizosphere**. In: LYNCH, J.M. (Eds.). The rhizosphere. John Wiley and Sons, New York, v. 570, p. 11-34, 1990.

CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.). Microbiologia do solo. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.41-57, 1992.

CECCATO-ANTONINI, S.R. **Guia prático de microbiologia**. Araras: UFSCar, p. 58, 1996 (Apostila).

CHAGAS-JUNIOR, A.F. Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato na fisiologia de quatro espécies de plantas de importância econômica da Amazônia. **Dissertação**. Manaus: INPA/ UFAM, p. 96, 2000.

CHAGAS, JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L.A. Tolerância de bactérias solubilizadoras de fosfatos à acidez e ao alumínio. **Ciências Agrárias e Ambientais: Revista da Universidade Federal do Amazonas**, v.1, n.1/2, p. 39-51, 2001

CHUMP, B.C.; ARMBRUST, E.V.; BARROS, J.A. Phylogenetic analysis of particleattached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. **Appl Environ Microbiol.** Jul, 65(7): v.3, p. 193-204, 1999.

CHAUVEL, A.; LUCAS, Y.; BOULET, R. 1987. On the genesis of soil mantel of the region of Manaus, Central Amazonia, Brasil. **Experientia**, v. 43, p. 234-241, 1987.

CHRISTENSEN, A. B. Uea decomposition as means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **Journal of Bacteriology**, v.52, p. 461-466., 1946.

CHRISTENSEN B.T.; JOHNSTON A.E. Soil organic matter and soil quality: Lessons learned from long-term experiments at Askov and Rothamsted. In: GREGORICH, E.G.; CARTER, M.R. (Eds.) Soil quality for crop production and ecosystem health. Amsterdam, Elsevier, p.399-430, 1997.

CHRISTENSEN, A. B.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; FLODGAARD, L. R.; MOLIN, S.; GRAM, L.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing-direct protein expression in *Serratia procamaculans* B5a. **Microbiology**, v 149, p. 471- 483, 2003.

CLEMENT, C.R. 1942 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, v.53, n.2, p.188-202, 1999.

COCHRANE, T.T. Land resources, soils and their management in the Amazon region: a state of knowledge report. In: HECHT, S.B. (Eds.). **Amazônia: Agriculture and land use research**. Cali, CIAT, p. 137-209, 1982.

COCHRANE, T. T.; SANCHEZ, AZEVEDO, L.G.; PORRAS, J. A.; GARVER, C. L. A Terra na América Tropical, v.3, p.16-18, 1985.

CONRAD, J.P. Catalytic activity causing the hydrolysis of urea in soil as influenced by several agronomic factors. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v.5, p.238-241, 1940a.

CONRAD, J.P. The nature of the catalyst causing the hydrolysis of urea in soils. **Soil Sci.**, v.50, p.119-134, 1940b.

CONRAD, J.P. The occurrence and origin of urease like activities in soil. **Soil Sci.**, v. 54, p.357-380, 1942a.

CONRAD, J.P. Enzymatic vs. microbial concepts of urea hydrolysis in soils. **J. Agron.**, v.34, p.1102-1113, 1942b.

CONRAD, J.P. Some effects of developing alkalinities and other factors upon urease like in soils. **Soil Sci. Am. Proc.**, v.5,p.171-174, 1943.

DALAL, R.C. Urease activity in some Trinidad soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.7, p. 5-8, 1975.

DAVIDSON. E.A; ARTAXO, NETO P. Globally significant changes in biological processes of the Amazon Basin: results of the Large-Scale Biophere- Atmosphere Experiment. **Global Change Biology**, v.10, p 529-529, 2004.

DENG, S.P.; TABATABAI, M.A. Cellulase activity of soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1347-1354, 1994.

DINIZ, F.M.; MARTIN, A. M. Hidrolisado protéico de pescado In: OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de Pesca**. São Paulo: Varela, 1999.

DOUGLAS, L.A.; BREMNER, J.M. A rapid method of evaluating different compounds as inhibitors of urease activity in soils. **Soil Biol. Biochem.**, v. 3, p.309-315, 1971.

DUNBAR, J.; TAKALA, S.; BARNES, S. M; DAVIS, J. A.; KUSKE, C.R. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Appl Environ Microbiol** **65**, p.1662-1669, 1999.

ELSAS, J.D. Van; DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Washington, DC, v.32, p.133-154, 1998.

EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, ed.2. **Rev. Atual** - Rio de Janeiro: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Documentos 1, p.212, 1997.

ESTERMAN, E. F.; McLAREN, A.D. Contribution of rhizoplane organism to the total capacity of plants to utilize organic nutrients. **Pl. Soil, Hague**, v.15, p.243-260, 1961.

FALCÃO, M.A. **Aspectos Fenológicos, Ecológicos e de Produtividade de Algumas Fruteiras Cultivadas na Amazônia**, v.2, p. 97, 1993.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. **EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, DF. p.200, 1998.

FERREIRA, S.J.F., LUIZAO, F.J., MIRANDA, S.A.F. *et al.* Nutrients in soil solution in an upland forest submitted to selective logging in central Amazonia. **Acta Amaz. Manaus**, v. 36, n. 1, p. 59-67, 2006.

FRANKEN, W; LEOPOLDO, P.R.; BERGAMIN FILHO, H. Fluxo de nutrientes através de águas naturais em floresta de terra firme na Amazônia Central. In: **Workshop on Biogeochemistry of Tropical Rain Forest: Problems for Research. Proceedings**. Piracicaba, São Paulo, p. 29-37, 1985.

FOHSE, D.; CLAASSEN, N.; JUNGK, A. Phosphorus efficiency of plants. I. External and internal P requirement and P uptake efficiency of different plant species. **Plant and Soil**, The Hague, v.110, p.101-109, 1988.

FULLBROOK, P.D.; KINETICS. 1983. In: GODFREY, T.; REICHEL, J. (Eds.). Industrial enzymology: the application of enzymes in industry. **Great Britain: The Nature**, 1983.

GARBEVA, P.; VANVEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant an soil type ad implications for disease suppressiveness. **Ann. Rev. Phytopathol.**v.42, p.243-270, 2004.

GIORDANO, R.L.C.: **Estudo da Coimobilização de Glicoamilase e Levedura para Fermentação Alcoólica Contínua de Matéria-Prima Amilácea**. Tese Doutorado. USP, S. Paulo-SP, 238p, 1992.

GODFREY, T. ;REICHEL, J. **Industrial enzymology**, The Nature Press, New York, p. 582, 1983.

GODFREY, T.; WEST, S.I. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey, T.

(Ed.). **Industrial Enzymology**. 2.ed., Macmillan Press, p. 120-138, London, 1996.

GOEDERT, W.J. Management of the cerrado soils of Brazil: a review. **J. Soil Sci.**, v.34, p.405-428, 1983.

GÓMES, K.A.; GÓMEZ, A.A. **Statistical procedures for agricultural research**. New York, John & Sons, p.680, 1984

GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A. G. Search and discovery of industrially significant actinomycetes. In *Microbial Products: New Approaches*, **Society for General Microbiology Symposium**, n. 44, ed. Baumberg, S., Hunter, I. S. and Rhodes, P. M. p. 343–383. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

GOULD, W.D.; COOK, F.D. ; WEBSTER, R.G. Factors affecting urea hydrolysis in several Alberta soils. **Plant Soil**, v. 38, p. 393-401, 1973.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p.763-781, 2004.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta amaz**, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004.

HASSAN, R.; SCHOLLES, R.; ASH, N. (eds.). **Ecosystems and Human Well-being**, Current state and trends. Island Press, Washington, DC. , v.1, p.917, 1995.

HAUSINGER R. P., KARPLUS P. A. In: Handbook of Metalloproteins, eds Wieghardt K., Huber R., Poulos T. L., Messerschmidt A. (John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, UK), p. 867–879, 2001.

HARGROVE, W.L.; THOMAS, G.W. Effect of organic matter on exchangeable aluminum and plant growth in acid soils. In: *Chemistry in the soil environment*, **Am. Soc. Agron., Soil Sci. Soc. Am.**, Madison, WI, p.151-166, 1981.

HARGROVE, W.L.; THOMAS, G.W: Extraction of aluminum from aluminum organic matter in relation to titratable acidity. **Soil Sci. Soc. Am. J**, v.48, p.1458-1460, 1984.

HECHT, S.B. Environment, development and politics: capital accumulation and the livestock Sector in eastern Amazonia. **World Development**, v. 13, p.663-684, 1985.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v 43, p.735-750, 1999.

HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, C.; HERSHBERGER, K. L.; PACE, N. R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **J. Bacteriol** **180**, p.366-76, 1998.

HUNTER-CEVERA, J.C. **The value of microbial diversity**. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 278-285, 1998.

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

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

JI, G; SILVER, S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. **Jornal Industry Microbiology**. v.14, p.61-75, 1995.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, p.1263-1270, 2005.

JORDAN, C. F.; STARK, N. Retention de nutrients en la estera de raices de un bosque pluvial amazónico. **Acta Cient. Venezolana**, n. 29, p. 263-267, 1978.

JOERGENSEN, R. G. ; SCHEU, S. Response of soil microorganisms to the addition of carbon, nitrogen and phosphorus in a forest Rendzina. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 859-866, 1999.

KARLEM, D.L.; DITZLER, C.A.; ANDREWS, S.S. Soil quality: Why and how? **Geoderma: An International Journal of Soil Science**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 145-156, 2003.

KANEKAR, P. P., NILEGOANKAR, S. S., SARNAIK, S. S., KELKAR, A. S. Optimization of Protease Activity of Alkaliphilic Bacteria Isolated From an Alkaline Lake in India. **Bioresource Technology**, v. 85, p. 87-93, 2002.

KAUSHIK, N. Effect of capsule maturity on germination and seedling vigour in *Jatropha curcas*. **Seed Science and Technology**, Wageningen, v. 31, n. 2, p. 449-454, 2003.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 345-351, 2002

KLOSE, S.; MOORE, J.M.; TABATABAI, M. A. Arylsulphatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. **Biol. Fert. Soils**. v. 29, p. 46-54, 1999.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p.561-594, 1999.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAM, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, 2005.

KUNS, Airton; DURÁN, Sandra. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1 São Paulo, Jan./Fev, 2002.

LANCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. Ed. Rima. São Paulo, SP, p. 531, 2004.

LANDI, L.; VALORI, F.; ASCHER, J.; RENELLA, G.; FALCHINI, L.; NANNIPIERI, P. Root exudate effects on the bacterial communities, CO<sub>2</sub> evolution, nitrogen transformations and ATP content of rhizosphere and bulk soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.38., p.509-516, 2006.

LUIZAO, F. J. Ciclos de nutrientes na Amazônia: respostas às mudanças ambientais e climáticas. In: E. A. DAVIDSON, ARTAXO, P. **Global Change Biology**, v.10, p. 519-529, 2004.

LOPES, A.C.; GOEDERT, W. J. Eficiência agrônômica de fertilizantes fosfatados para culturas anuais, perenes, pastagens e reflorestamento. In: SEMINÁRIO SOBRE RECUPERAÇÃO DE FÓSFORO, 1987, São Paulo. **[Trabalhos apresentados]**. São Paulo: Ibrafos, p. 2449, 1987.

LOPES, P. S.; GUILHERME, L.R.G. Fertilizantes e corretivos agrícolas: Sugestões de manejo para uso eficiente. In: DECHEN, A.R.; BOARETO, A. E.; VERDADE, F.C., **Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição mineral de plantas**, 20, Piracicaba, 1992. Anais. Campinas, Fundação Cargill, p.39-70, 1992.

LLOYD, A.B.; SHEAFFE, MJ. Urease activity in soils. **Plant and Soil**, The Hague, v.39, p.71-80, 1973

LYNCH, J.M.; SLATER, J.H.; BENNETT, J.A.; HARPER, S.H.T. Cellulase activities of some aerobic micro-organisms isolated from soil. **Journal of General Microbiology**, v.127, p. 231-236, 1981.

MACRAE, A. The use of 16s rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 77-82, 2000.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganism**, 8. Ed., Prentice Hall, New Jersey, p. 986, 1996.

MALUF, E.; WOLFGANG, K. **Dados Técnicos para a Indústria Têxtil**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de confecção, p. 198, 2003.

MARCONDES, D. M. S. S. V.; SILVA, D. M.; VITTI, L. S. S.; SILVA, J. C. Celulase do extrato de rúmen bovino. **Energia Nuclear e Agricultura**, Piracicaba, v. 5, n. 2, p. 145-160, 1983.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, v. 40, p.339-346, 2000.

MARRIEL, I. E. **Circular Técnica**, 72. Caracterização de Microrganismos Dominantes na Rizosfera de Plantas Cultivadas em Solo Ácido. EMBRAPA Milho e

Sorgo, p.1-8, 2005.

MAY, P.B.; DOUGLAS, L.A. Assay for soil urease activity. **Plant Soil**, v.45 p.301-305, 1976.

MCCOY, M. Novozymes emerges. **Chemical & Engineering News**, v. 19, p. 23-25, 2000.

MELO, M. G. S; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Uso do meio sólido para screening de atividade amilolítica em *Arpegillus niger*. Arquivos de Biologia e Tecnologia, v.32, p.613-620, 1989.

MENDONÇA, E. S; MATOS E. S. **Matéria Orgânica do Solo**: Método de análise. Viçosa: UFV, 2005. 107p.

MERCKX, R.; DIJKSTRA, A.; HARTOG, A. den; VEEN, J.A. Van. Production of root-derived material and associated microbial growth in soil at different nutrient levels. **Biology and Fertility of Soils, West Germany**, v.5, p.126-132, 1987.

MILLER, H.J.; HENKEN, G.; VAN VEEN, J.A. Variation and composition of bacterial population in the rhizosphere of maize, wheat, and grass cultivars. **Can. J. Microbiol.**, v.35,p.656-660, 1989.

MONIZ, A.C. et al. **A responsabilidade social da Ciência do Solo**. Campinas. Sociedade Brasileira do solo, p. 365-378, 1988.

MOREIRA, F. W. Características químicas dos solos e colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares em plantas introduzidas em clareiras da Província Petrolífera de Urucu, Coari. UFAM, Manaus, Amazonas, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras, Universidade Federal de Lavras, p. 625, 2002.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, p. 729, 2006.

MUYZER, G.; RAMSING, N.B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. **Water Science Technology**, v.32, p. 1-9, 1995.

NANNIPIERI, P.; JOHNSON, R.L.; PAUL, E.A. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.10, p.223-229, 1978.

NANNIPIERI, P.; GREGO, S; CECCANTI, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: BOLLAG, J.-M.; STOTZKY, G. (Ed.). **Soil Biochemistry**, v.6, Marcel Dekker, New York, p. 293-354, 1990.

NAHAS, E. WALDEMARIN, M. M. Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 44, p. 5-10, 2002.



OMAR, S.A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v.14, n.2, p.211-218, 1998.

NAHAS, E. **Ciclo do fósforo: transformações microbianas**. Jaboticabal: FUNEP, p. 67, 1991.

NAM, K.D. et al: Simultaneous Saccharification and Fermentation of Unheated Starch by Free, Immobilized and Coimmobilized Systems of Glucoamylase and *S. cerevisiae*. **J. Ferm. Tech**, v. 66, p. 427-32, 1988.

NAVARRO, A.R. et al: Production of Ethanol by Yeasts Immobilized in Pectin. **European J. Applied Microb. Biotech.** v. 17, p. 148-151, 1983.

NICHOLAIDES, J.J.; SANCHEZ, P. A.; BANDY, D.E.; VILLACHICA, J.H.; COUTU, A.J.; VALVERDE, C.S. Crop production systems in the Amazon Basin. In: MORAN, E. (Eds.) **The dilemma of Amazonia Development**. Westview, p. 101-153, 1983.

OLIVEIRA, A. N; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S; CHAGS JÚNIOR, A. F. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p. 204-210, 2006.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A. Sazonalidade, colonização radicular e esporulação de Fungos Micorrízicos Arbusculares em plantas de cupuaçuzeiro e de pupunha na Amazônia Central. **Revista Ciência Agrária**. n. 40, p. 145-154, 2003.

OLIVEIRA, L. A.; GUITTON, L. T.; MOREIRA, F.W. Relações entre colonizações por fungos micorrízicos arbusculares e teores de nutrientes foliares em oito espécies florestais da Amazônia. **Acta Amazônica**, n. 29, p.183-193, 1994.

OVREAS, L.; DAAE, F. L; TORSVIK, V. V. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **J Biotechnol** **64**, p.53-62, 1998.

OVREAS, L.; TORSVIK, V. V. Microbial diversity and Community Structure in two different Agricultural Soil Communities. **Microb Ecol** **36**, p. 303-315, 1998.

OVREAS, L.; DAAE, F. L; TORSVIK, V. V. Distribution of bacterioplankton in meromitic Lake Saeleenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Appl. Environ Microbiol** **63**, p. 3367-3373, 1997.

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial ecology**, New York, v.9, p. 1-55, 1986.

PARK I. S.; HAUSINGER R. P. **J. Bacteriol**, v.177, p.1947–1951, 1995.

PASSAGLIA, M.P.; ZAHA, Arnaldo. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003, 381 p.

PAUL, N.B.; RAO, W.V.B.S. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.35, n.1, p.127-132, 1971.

PEDROSO, A.A. **Estrutura da comunidade de Bactéria do trato intestinal de frangos suplementados com promotores de crescimento**. Doctor's Thesis. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba (SP), p. 103, 2003.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia, conceitos e aplicações**. MAKRON, São Paulo, v.1, ed.2, p. 524, 1996.

PEREIRA, P.A.A.; BLISS, F.A. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N<sub>2</sub> fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally-controlled conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.115, n.1, p.75-82, 1989.

PEREIRA, J.C.; NEVES, M.C.P.; DROZDOWICZ, A. Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos. Seropédica: Embrapa - CNPAB (**Embrapa - CNPAB. Documentos**, 26), p.20, 1996.

PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F. ; TEBBE, CC. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single strandconformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, p.930-936, 2000.

PETTIT, N.M.; SMITH, A. R. J.; FREEDMAN, R. B.; BURNS, R. G. **Soil urease: activity, stability and kinetic properties**. Soil Biol. Biochem. v.8, p. 479-484, 1976.

PETKER, A.S.; RAI, P. K. Effect of fungicides on activity, secretion of some extra cellular enzymes and and growth of *Alternaria alternata*. **Indian J. Appl. Pure. Biol.**, V.7, n.1, p. 57-59, 1992.

PÖTTKER, D. ; BEN, J.R. Calagem em solos sob plantio direto e em campos nativos do Rio Grande do Sul. In: NUERNBERG, N.J., ed. Conceitos e fundamentos do sistema plantio direto. Lages, SBSCS-Núcleo Regional Sul, p.77-92, 1998.

RAIJ, B. van. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: Agronômica Ceres, **Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, p.343, 1991.

RANJARD, L.; POLY, F.; COMBRISSE, J.; RICAUME, A.; GOURBIERE, F.; THIOULOUSE, J.; NAZARET, S. Heterogenous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). **Microb Ecol** 39, p. 263-272, 2000.

RIVAS, B.; MOLDES, A. B.; DOMINGUEZ, J. M.; PARAJÓ, J. C. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep licor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 93 - 98, 2004.

ROBSON, L.M.; CHAMBLISS, G.H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology** v.11, p.626-644, 1989.

RODRIGUES, T.E. Solos da Amazônia (1994). In: ALVAREZV. V. H; FONTES, L.E.F.; FONTES, M. P. F (Eds.). O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado. Viçosa: UFV/DPS/SBCS, p.19-60, 1996.

RONDON, M.R.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. the Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends Biotechnol** 17, p. 403-9, 2001.

ROSA, D. S.; PANTANO FILHO, R. **Biodegradação: um ensaio com polímeros**. São Paulo: Editora Universitária São Francisco, 2003.

ROSSELÓ-MORA, R; AMANN, R. 2001. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

ROTINI, O. T. La transformazioni enzimatica dell-urea nell terreno. Ann. **Labor. Ric. Ferm.**, v.3, p.134-154, 1935.

ROVIRA, A.D.; MCDUGALL, B.M. Microbiological and biochemical aspects of the rhizosphere. In: McLAREN, A.D.; PETERSON, G.H. (Eds.). **Soil Biochemistry**. New York: Dekker, v.1, p.417-463, 1976.

SAID, S; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ed. **Legis Summa**. Ribeirão Preto, 2004.

SALATI, E; SANTOS, A.A.; LOVEJOY, T.E., KLABIN, I. **Por que salvar a floresta amazônica?** Manaus. Ed. INPA. p.114, 1998.

SANCHES, P. A. **Suelos del tropic**: características y manejo. San José: IICA, p. 634, 1981.

SANCHEZ, P.A; VILLACHICA, J.H.; BAND, D.E. Soil Fertility dynamics after clearing a tropical rainforest in Peru. **Soil Science Society American Journal**, v. 47, p.1171-1178, 1983.

SANTOS, P.C.T.C. dos; VIEIRA, M. de N.F. et al. **Os solos da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará**. Belém: FCAP, (FCAP. Informe Didático, 5), p. 60, 1983.

SAWADA, KAZUYA; SUGIMOTO, MASAKATU; UEDA, MITSUO. Hydrophilic Treatment of Polyester Surfaces Using TiO<sub>2</sub>: Photocatalytic Reaction. *Textile Research Journal*, pag.119-122, setembro, 2003  
SCHLOSS, P. D. HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Curr Opin Biotechnol** 14, p. 303-310, 2003.

SAXENA, A.; SAXENA, D. K.; SRIVASTAVA H.S. The influence of glutathione on physiological effects of lead and its accumulation in moss *Sphagnum squarrosum*. **Water Air Soil Pollut**. v.143, p.351-361, 2003.

SCHMIDT, G.; LASKOWSKI, S. R. M. Phosphate ester cleavage (Survey). In: Boyer PD, Lardy H, Myrback K (eds). The enzymes, 2nd edn. **Academic Press**, New York, p. 3-35, 1961.

SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. (Eds). Methods in soil biology. Springer, Heidelberg Berlin New York, 1996.

SCHUBART, H.O.R.; FRANKEN, W.; LUIZÃO, F.J. Uma floresta sobre solos pobres. **Ciência Hoje**, v.10, p.26-32, 1984.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, CC. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) – Linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, p.3556-3565, 2000.

SENA, AMANDA REGES DE. Seleção de Fungos do Semi-árido Baiano Secretores de Hidrolases de Interesse em Alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, 2006.

SENE, C. P; MARQUES, P.D.; FERRO, P. R. S; PINHEIRO, D. M; PASTORE, C. M. Seleção de microrganismos produtores de lipase alcalina. **Enzitec**. 2002, Brasília, Livro de Resumo, p. 72-73, 2002.

SHARMA, S. D.; SINGH, M. Environmental factors affecting absorption and bio-efficacy of glyphosate in florida beggarweed (*Desmodium tortuosum*). **Crop Protec.**, v. 20, p. 511-516, 2001.

SHIEH, T. R.; WARE, J.H. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. **Applied Microbiology**, Washington, v.16, n.9, p.1348-135, 1968.

SHORT, J. M. Recombinant approaches for accessing biodiversity. **Nat Biotechnol**, v.15, p.1332-1333, 1997.

SILVA, D.; MARTINS.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viricatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agroindustrial byproducts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p. 318-324, 2002.

SIQUEIRA, J. O; FRANCO, A. A. **Biotechnologia do solo**: Fundamentos e Perspectivas. Brasília: MEC/ABEAS, p.236, 1988.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p.1-11, 1996.

SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; Production and Characterization of Amylases by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation Using Agro Industrials Products. **International Journal of Food Engineering**. Vol. 2 : Iss. 3, Article 6, 2006.

SPOSITO, G.; ZABEL, A. The assessment of soil quality. *Geoderma: Na International Journal of Soil Science*, Amsterdam, v. 114, n.3/4, p. 143-144, 2003.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. Endophyte of maize leaves. *Bioresure Technology*, 83: 105-109, 2002.

STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciênc.Tecnol. Aliment.*, v.18, n.4, p. 382-385, 1998.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa-CNPAB. Documentos, 93)p. 58, 1999.

TABATABAI, M.A. Enzymes. In: WEAVER, R.W.; AUGLE, S.; BOTTOMLY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Eds). Methods of soil analyses. Part 2. Microbial and biochemical properties, n.5. **Soil Society of America**, Madison, p. 775-833, 1994.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Michaelis constants of soil enzymes. **Soil Biol. Biochem**, n.3, p. 317-323, 1971.

TAYLOR, E., MCALOON, A. J.; CRAIG, J. C.; YANG, P.; WAHJUDI, J.; ECKHOFF, R. S. Fermentation and costs of fuel ethanol from corn with quick-germ process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 94, p. 41-19, 2001.

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

TIWARI, S.C.; TIWARI, B.K.; MISHRA, R.R. Enzyme activities in soils: effects of leaching, ignition, autoclaving and fumigation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p.583-585, 1988.

TORSVIK, V; DAAE, F. L; SANDAA, R.A; OVREAS, L. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, Washington, v.64, p. 53-52, 1998.

TORSVIK, V; GOSKOYR, J; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n. 2, p. 782-787, 1990.

TORSVIK, V; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v.5, n.3, p. 240-245, 2002.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TRÜPER, H.G. Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. **Biodiversity and Conservation**, London, v.1, n.2, p. 227- 236, 1992.

UEDA, K.; SEKI, T.; KUDO, T.; YOSHIDA, T.; KATAOKA, M. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. **J. Bacteriol.**, 181, 78-82, 1999.

VALINSKY, L.; DELLA-VEDOVA, G.; SCUPHAM, A. J. ALVEYS, S.; FIGUEROA, A.; YIN, B.; HARTIN, R. J.; CHROBAK, M.; CROWLEY, D.E.; JIANG, T.; BORNEMAN, J. Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. **Appl Environ Microbiol** **68**, p. 3243-50, 2002.

VANCE, E. D.; BROOKS, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. **C. Soil Biol. Biochem.**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 571-586, 2003.

VICENT, J. M. *A manual for the practical study of root-nodules bacteria*. Oxford, USA: **Blackwell Science Publication**, p. 140, 1970.

VIEIRA, L. S. **Manual da Ciencia do Solo**. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres, p.464, 1975.

VIEIRA, L.S.; SANTOS, P.C.T. dos. Amazônia: seus solos e outros recursos naturais. São Paulo: Ceres, p. 420, 1987.

WALKER, I.; FRANKEN, W. Ecosistemas frágeis: a floresta da terra firme da Amazônia Central. **Ciência Interamericana**, v.23, p.9-21, 1983.

WARD, D. M; BATESON, M.M; WELLER, R. e RUFF-ROBERTS, A. L. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. **Advances in Microbial Ecology**, v.12, p.219-286, 1992.

WARDLE, D.A.; HUNGRIA, M.A. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (eds.) *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília, **Embrapa-SPI**, p.193-216., 1994

WILSON, E.O. The current state of biology diversity. In: WILSON, E.O. (org). **Biodiversity**. Washington: National Academy Press, p. 3-18, 1998.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W.J. Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1694, p. 299-310, 2004.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, New York, v. 69, p. 99-151, 2000.

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4 Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. **Microbiological Reviews**, v.52, n.3, p.305 – 317, 1988.

WOODWARD, J. Xylanases: Functions, Properties and Applications. In: Introduction to Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, cap. p. 9-30, 1984.

XAVIER, G. R.; SILVA, F.V.; ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G. Adaptação de método para extração de DNA de microrganismos associados a raízes de plantas. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia** (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 171). p.24, 2004.

ZAHRAN, M. A.; MAHMOUD, B. K.; MASHALY, L.A. Introduction of non-conventional fodders under drought and salinity stresses of arids lands. *Proceedings Workshop in Livestock and Drought: Policies of a coping with Changes*. Desert Research Center (DRC), Cairo, p. 75-79, 1999.

ZANIN, G. M.: *Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amilglicosidase Imobilizada*. Tese Doutorado, UNICAMP, Campinas-SP, 454 p. 1989.

ZANTUA, M. I.; BREMNER, J. M. Stability of urease in soils. **Soil Biol.Biochem**, v.9, p.135-140, 1977.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade Microbiana como Indicador de Qualidade do Solo. **Caderno de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v.20, n.3, p.391-411, 2003.