

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO ALIMENTO
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E MICROBIOLOGIA APLICADA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS QUERATINOLÍTICAS PROVENIENTES
DE SOLOS BRASILEIROS**

Evelise Bach

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre, 19 de novembro de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO ALIMENTO
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E MICROBIOLOGIA APLICADA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS QUERATINOLÍTICAS PROVENIENTES
DE SOLOS BRASILEIROS**

Evelise Bach

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Periódico sugerido: *Brazilian Journal of Microbiology*

Banca examinadora: Prof. Dr. Alexandre José Macedo e
Prof. Dr. Pedro Alberto Selbach

Artigo apresentado como um dos requisitos para a aprovação na atividade de ensino
Trabalho de Conclusão do Bacharelado em Ciências Biológicas

Porto Alegre, 19 de novembro de 2008.

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS QUERATINOLÍTICAS PROVENIENTES DE SOLOS BRASILEIROS

Evelise Bach; Adriano Brandelli

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; evelisebach@hotmail.com

RESUMO

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com microrganismos produtores de queratinases pelo seu potencial biotecnológico e por serem causadores de doenças em animais. Porém, muito antes do seu papel biotecnológico, estas enzimas têm relevância ecológica realizando a reciclagem destes resíduos queratinosos na natureza. As bactérias reportadas como queratinolíticas pertencem principalmente aos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, porém estudos recentes mostram que a diversidade de bactérias queratinolíticas deve ser muito maior. Este trabalho tem como objetivo selecionar e identificar bactérias cultiváveis provenientes de solos de matas nativas brasileiras, que sejam produtoras de queratinases para contribuir com o conhecimento da diversidade desta característica na natureza e buscar novos microrganismos com potencial biotecnológico. Foram isoladas bactérias de amostras de solo oriundas de Bento Gonçalves e São Francisco de Paula. Estes isolados, juntamente com bactérias originadas da Bacia Amazônica, foram testados quanto a sua capacidade de crescer em meio ágar farinha de pena 1 % e produzir halos em ágar leite. As bactérias proteolíticas foram testadas quanto a sua atividade queratinolítica e foram identificadas através de suas características morfológicas, microscópicas e bioquímicas, além da

identificação molecular através do seqüenciamento do fragmento 16S do DNA ribossomal. Obtivemos 18 isolados queratinolíticos, 15 Gram positivos e 3 Gram negativos que apresentaram grande capacidade proteolítica. Os testes bioquímicos e os seqüenciamentos realizados sugerem que os isolados sejam pertencentes às espécies *B. subtilis*, *B. cereus* e aos gêneros *Aeromonas* e *Serratia* do grupo δ -Proteobacteria.

Palavras-chave: Isolamento; solos brasileiros; queratinase; hidrólise de penas; *Bacillus*.

INTRODUÇÃO

Queratinas são proteínas fibrosas e insolúveis encontradas em vertebrados superiores com função principal protetora e estrutural (7). A queratina é encontrada largamente na natureza, pois constitui peles, pêlos, penas, unhas, cascos e escamas de vertebrados superiores. Esta proteína é um polipeptídeo altamente recalcitrante que, pela sua conformação com grande quantidade de pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, resiste às enzimas proteolíticas comuns, como pepsina, tripsina e papaína (32, 43). Porém, mesmo sendo de difícil degradação, ela não se acumula na natureza, o que sugere a existência de microrganismos decompositores naturais, produtores de queratinases.

As queratinases são proteases capazes de hidrolisar a queratina sendo úteis em processos relacionados à bioconversão de resíduos de queratina em ração e fertilizantes; depilação enzimática nas indústrias de couro e cosméticos; uso como detergentes e desenvolvimento de polímeros biodegradáveis a partir das fibras de queratina. Além disto,

novas aplicações vêm surgindo como a de aumentar a disponibilidade de medicamentos em alguns tecidos e degradação de príons (6).

Queratinases são produzidas por fungos e bactérias que têm sido isoladas de solo onde há material queratinoso depositado (21, 38). Dentre os fungos, queratinases são descritas principalmente produzidas por dermatófitos, isolados de ferimentos humanos e de outros animais. Dentre as bactérias, a atividade queratinolítica vem sendo amplamente descrita para os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* (8, 22, 23), porém alguns estudos mostram que a diversidade de bactérias com esta capacidade é muito maior (26).

Entre as Gram positivas, novos isolados queratinolíticos vêm sendo identificados como *Arthrobacter* sp. (26), *Microbacterium* sp. (46), e *Kocuria rosea* (2, 3). Muitas destas linhagens podem degradar a queratina de penas dentro de 48 horas (6).

A atividade queratinolítica tem sido mais recentemente associada com as bactérias Gram negativas como as linhagens degradadoras de pena *Vibrio* sp. (39), *Xanthomonas maltophilia* (10), *Stenotrophomonas* sp. (48) e *Cryseobacterium* sp. (37) que têm sido isoladas de penas de frango em decomposição. Fato este corroborado por Riffel e Brandelli (38) que reportaram uma predominância de Gram negativas quando realizado o isolamento a partir de penas em decomposição. Lucas et al. (26) numa investigação da diversidade de bactérias queratinolíticas entre isolados de solo sob temperaturas mesofílicas, revelou que linhagens de Proteobacteria e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* são predominantes.

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com microrganismos queratinolíticos com potencial biotecnológico, porém muito antes disto as queratinases têm relevância ecológica que é muito pouco abordada. Ainda não é conhecida a distribuição de degradadores de

penas através do domínio Bacteria, pois nosso conhecimento básico sobre a diversidade e fisiologia bacteriana é baseado em limitantes métodos de cultivo (12).

Este trabalho tem como objetivo selecionar e identificar isolados bacterianos cultiváveis provenientes de solos brasileiros, que sejam produtores de queratinases para contribuir com o conhecimento da diversidade desta característica na natureza e buscar novos microrganismos com potencial biotecnológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Meios de cultivo

As penas de frango utilizadas como componente do meio de cultura caldo pena (CP) foram cedidas em lotes de 2 kg por uma empresa avícola local (Avipal, Porto Alegre, RS). A lavagem das penas seguiu o protocolo descrito por Bernal (2) com secagem durante 30 min por ar quente aquecido com resistência de 350 W. A farinha de pena utilizada como componente do meio de cultura caldo farinha de pena (CFP) e ágar farinha de pena (AFP) foi obtida a partir do processamento de cocção sob pressão e moagem da empresa Bunge (Esteio, RS) em amostras de 1 kg. Além da fonte de queratina a 1 %, estes meios possuem $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl, $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de K_2HPO_4 e $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 e o AFP possui 15 g L^{-1} de ágar bacteriológico. Para os testes de proteólise utilizou-se ágar leite (AL) contendo peptona de carne $5,0 \text{ g L}^{-1}$, extrato de levedura $3,0 \text{ g L}^{-1}$, ágar bacteriológico 12 g L^{-1} e leite desnatado 100 mL L^{-1} . Todos os meios foram autoclavados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min.

Isolamento dos microrganismos

As bactérias foram isoladas de amostras de solo de diferentes pontos de dois biomas brasileiros, Mata Atlântica e Floresta Amazônica. As bactérias de solo amazônico, que se encontram na bacterioteca do laboratório, foram fornecidas pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e pela Universidade de São Paulo (USP). Estes isolados foram reativados em ágar Triptona Caseína de Soja (TSA, Mast Diagnostics, Merseyside, UK) e testados quanto a seu crescimento no AFP 1 %, que possui a queratina como única fonte de carbono, nitrogênio e enxofre.

Dez amostras da camada superficial do solo de matas nativas foram coletadas em pontos aleatórios de Bento Gonçalves e dez, nas mesmas condições, em São Francisco de Paula, ambos municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras foram diluídas numa proporção de 2:1 em Tampão Fosfato Salino (NaCl 8,76 g L⁻¹, NaH_2PO_4 1,38 g L⁻¹; pH 6,2). Alíquotas de 5 ml desta solução foram inoculadas em 50 ml de CFP 1 % e incubadas no agitador orbital a 30 °C por 48 horas, 125 rpm. A suspensão de bactérias foi transferida em triplicata para placas AFP 1 % e incubadas a 30 °C por no máximo 48 horas. Colônias isoladas que possuíram a habilidade de crescer neste meio foram repicadas por esgotamento até a obtenção de colônias puras. Colônias com diferentes morfologias foram selecionadas aleatoriamente com o intuito de obter uma amostragem diversa.

Atividade proteolítica e queratinolítica

A atividade proteolítica foi realizada em duplicata através do teste de formação de halos em placas de AL nas temperaturas de 22, 30, 37, 44 e 55 °C por até 48 horas. Foi calculada a relação entre o diâmetro de halo obtido e o diâmetro de crescimento da colônia

(halo/crescimento) (34). Os microrganismos formadores de halos foram inoculados em duplicata em meio CFP e CP e incubados no agitador orbital a 30 °C por 11 dias a 125 rpm para verificar hidrólise visual da farinha de pena e das penas. Para corroborar com o resultado visual, quantificou-se a atividade queratinolítica dos isolados. Esta quantificação foi realizada através da medição da degradação das penas (45) utilizando o método descrito por Lowry et al. (25). As amostras de 11 dias de cultivo foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e a proteína solúvel do sobrenadante foi quantificada sob uma absorbância de 750 nm. Utilizou-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como proteína padrão.

Identificação dos isolados

Os isolados que se destacaram na atividade de hidrólise foram identificados através de suas características morfológicas, microscópicas e bioquímicas com a utilização do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (19, 20) e MacFaddin (28). Além disso, foi realizada a identificação molecular.

As extrações de DNA total foram realizadas ressuspendendo células centrifugadas em solução salina (NaCl 0,9 %) com posterior aquecimento a 99 °C por 10 min para as bactérias Gram negativas (11). Os isolados Gram positivos tiveram seu DNA total obtido ressuspendendo as células centrifugadas em tampão SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA e 20 mM TRIS; pH 7,4) com posterior tratamento com lisozima (1 mg/mL), precipitação com NaCl 5 M e limpeza com clorofórmio (36).

A amplificação do fragmento 16S do DNA ribossomal foi realizada a partir de 5 µL da amostra de DNA numa reação de 100 µL. Foi amplificado aproximadamente 1500 pb

utilizando 5 µL dos primers universais para eubactérias 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), correspondente à posição do gene 16S do RNAr de *Escherichia coli* (24). O PCR foi realizado com o uso da *Taq* polimerase Platinum® (Invitrogen), desnaturando por 5 min a 94 °C seguido por 30 ciclos nas seguintes condições: 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C, 2 min a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C. Os produtos do PCR foram purificados com o kit PureLink™ PCR (Invitrogen) e analisados em gel de agarose 0,8 %. O seqüenciamento foi realizado utilizando uma concentração de 30 a 60 ng de DNA purificado, adicionando 4,5 pmol do primer 27f ou 1525r e 2 µL de BigDye Terminator RR-100 (Applied Biosystems) num volume final de 10 µL no seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As seqüências foram analisadas e editadas através do software Chromas Lite versão 2.01 e BioEdit versão 7.0.9.0 (18), respectivamente. A identificação das bactérias foi realizada através da utilização da ferramenta BLAST (National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]) visando buscar seqüências homólogas no GenBank.

RESULTADOS

Isolamento e seleção dos isolados

Foram selecionados 34 isolados de morfologias diversas capazes de crescer em AFP, que foram nomeados com as letras de A a J para Bento Gonçalves e de K a T para São Francisco de Paula. Além disso, foram selecionadas as bactérias amazônicas que

cresceram em AFP, tendo a nomenclatura de BL (UFAM) ou BCM (USP). Destes, foram selecionados 18 isolados proteolíticos e capazes de hidrolisar visualmente a pena, produzindo grande quantidade de proteína solúvel, 15 Gram positivos e 3 Gram negativos (Tabela 1).

Atividade proteolítica e queratinolítica

Os padrões da relação do diâmetro halo/crescimento obtidos em AL nas diferentes temperaturas foram bastante diferentes comparando os isolados (Fig. 1), destacando-se as Gram negativas A22, K12 e P3 que obtiveram grande produção de halo em relação a seu crescimento em no mínimo três temperaturas diferentes.

No geral, todas as bactérias cresceram bem e produziram halos nas temperaturas mesofílicas de 22 °C, 30 °C e 37 °C. Na temperatura de 44 °C, destacam-se os isolados P22, Q23 e K12 devido a sua alta produção de halo em relação ao crescimento. Enquanto que, sob mesma temperatura, nem a bactéria BL2 nem a BL10 puderam ser quantificadas devido ao seu grande crescimento e a P3 não cresceu. As bactérias BL4, E22, P22, Q23, Q34 e a P3 não cresceram a 55 °C, enquanto que muitos dos demais isolados tiveram um crescimento bastante inexpressivo nesta temperatura, mas com produção de halo, fazendo com que a relação halo/crescimento ficasse alta. O isolado A22 não cresceu nas temperaturas de 22 °C nem na de 37 °C e o J14 não foi contabilizado quanto a sua formação de halos em AL devido ao seu crescimento de forma filamentosa que impossibilitou a quantificação.

Tabela 1. Análises microscópicas e testes bioquímicos realizados com os isolados queratinolíticos provenientes de solos brasileiros. (+): positivo; (-): negativo; ND: não determinado; TSA: Ágar Triptona de Soja; VM: Vermelho de Metila.

Isolados	Gram	Esporos	Catalase	NaCl 5% 10%	TSA 5°C	44°C	55°C	OF	Citrato	Gelatinase	Amilase	VM	
BL 02	bastonete G+	central	+	+	+	-	+	-	OF	-	+	+	-
BL 03	bastonete G+	central	+	+	+	-	+	+	OF	-	+	+	-
BL 04	bastonete G+	central	+	+	+	-	+	-	OF	-	+	+	-
BL 06	bastonete G+	central	+	+	+	-	+	-	OF	-	+	+	-
BL 07	bastonete G+	central	+	+	+	-	+	+	OF	-	+	+	-
BL 08	bastonete G+	central	+	+	+	-	+	+	OF	-	+	+	-
BL 09	bastonete G+	central	+	+	+	-	+	+	OF	-	+	+	-
BL 10	bastonete G+	central	+	+	-	-	+	+	OF	-	+	+	-
H13	bastonete G+	central	+	+	-	-	+	+	OF	-	+	+	+
E22	bastonete G+	central	+	+	-	-	+	-	OF	-	-	-	+
P22	bastonete G+	central	+	+	-	-	+	-	OF	-	-	+	+
Q23	bastonete G+	central	+	+	-	-	+	-	OF	-	-	+	+
Q34	bastonete G+	central	+	+	-	+	+	-	OF	-	-	-	+
J14	bastonete G+	central	+	ND	ND	-	+	-	OF	-	-	-	+
A22	bastonete G-	-	+	ND	ND	-	+	-	OF	-	-	-	ND
P3	bastonete G-	-	+	ND	ND	-	-	-	OF	+	+	-	-
K12	bastonete G-	-	+	ND	ND	+	+	-	OF	-	+	-	+

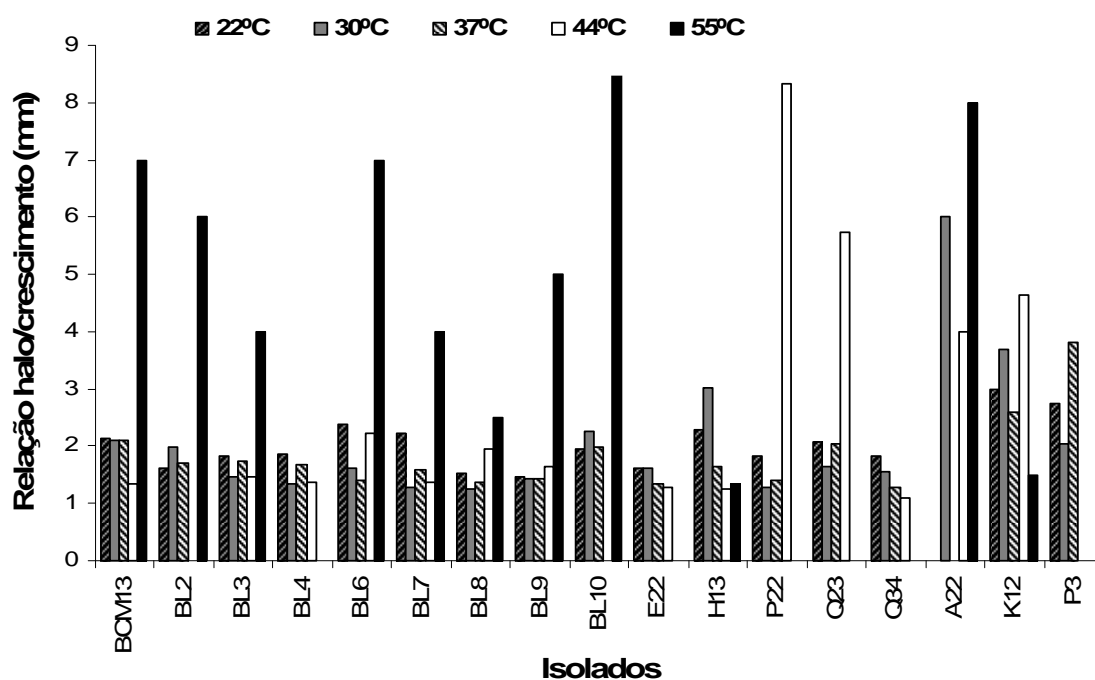


Figura 1. Relação entre halo obtido em ágar leite (AL) e crescimento da colônia (diâmetro) de microrganismos queratinolíticos isolados de solos brasileiros, nas diferentes temperaturas por 24 horas.

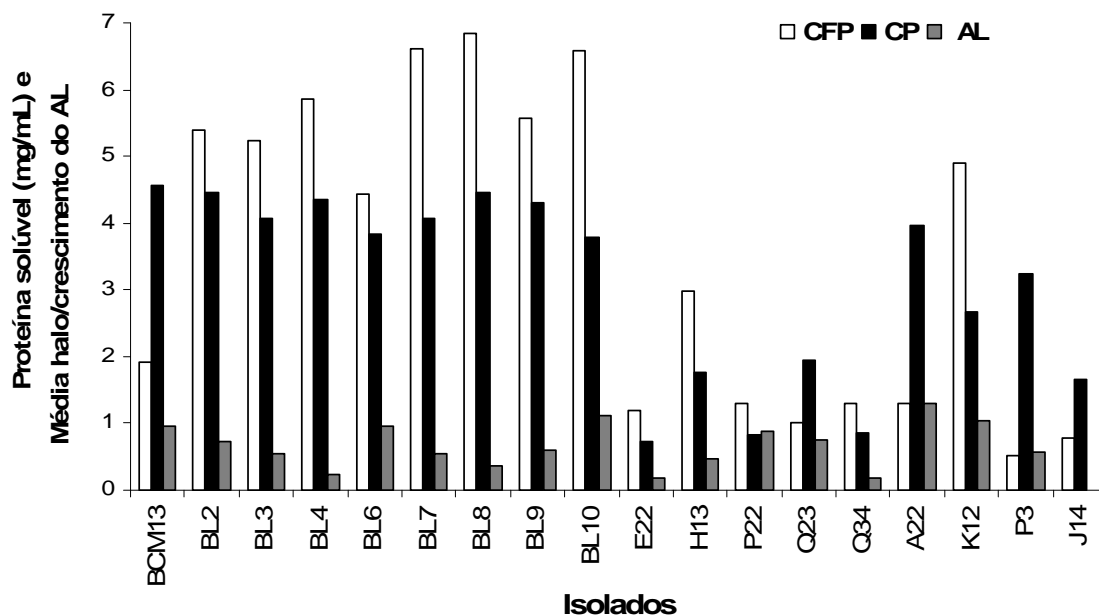


Figura 2. Proteína solúvel produzida após 11 dias de cultivo em caldo farinha de pena (CFP) e caldo pena (CP) sob agitação a 30 °C e média das relações halo/crescimento obtidas em ágar leite (AL) nas diferentes temperaturas por 24 hs.

A maioria dos isolados, em 11 dias, degradou as penas em fragmentos de 2 a 4 mm de comprimento, degradando a queratina provavelmente a peptídios de baixa massa molecular de acordo com observações em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE, dados não apresentados). A degradação visual tanto em CFP quanto em CP variou entre os isolados e em alguns deles, não foi refletida numa maior quantificação de proteína solúvel. Sendo assim, os microrganismos foram selecionados numa combinação de um conjunto de fatores, tanto por sua atividade proteolítica em AL, pela sua degradação visual do CFP e CP e pela produção de proteína solúvel (Figura 2).

A quantificação de proteína solúvel também variou entre os isolados e entre os meios utilizados, sendo que alguns tiveram melhores resultados no CFP (as BLs e o K12) e

outros no CP (BCM 13, A22, P3 e J14). No geral, as bactérias Gram positivas amazônicas (BLs) obtiveram melhores resultados tanto na degradação visual das penas quanto na produção de grande quantidade de proteína solúvel.

As bactérias BCM já haviam sido previamente identificadas. No teste de crescimento em AFP, cresceram as bactérias *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. thuringensis* e *B. subtilis* (BCM 13), sendo que só a última foi satisfatória na sua capacidade de degradar penas. As bactérias *Pseudomonas* sp. e *P. stutzeri* não apresentaram crescimento neste meio.

Identificação dos isolados

De acordo com o sequenciamento do 16S DNAr, os isolados amazônicos denominados BL foram identificados como *B. subtilis* e os demais isolados Gram positivos (J14, E22, H13, P22, Q23 e Q34) foram identificados como pertencentes ao cluster do *Bacillus cereus*. As análises morfológicas, microscópicas, os testes bioquímicos e o sequenciamento do 16S DNAr nos sugere que a bactéria Gram negativa K12 pertença ao gênero *Aeromonas*, família Vibrionaceae e que a P3 pertença ao gênero *Serratia*, família Enterobacteriaceae. O isolado A22 não pôde ser identificado. O sequenciamento deverá ser repetido para identificarmos o isolado A22 e obtermos identificação em nível de espécie para os demais.

DISCUSSÃO

Bactérias queratinolíticas de caráter termofílico vêm sendo grandemente reportadas (6, 17, 22, 23, 29, 45, 48, 50). Contudo, bactérias mesofílicas devem ter maior relevância

ecológica na reciclagem de resíduos na natureza (26) e são interessantes visando aplicações biotecnológicas já que enzimas mesofílicas diminuem a demanda de energia consumida no processo industrial. Nossos isolados apresentaram um caráter mesofílico, o que é esperado para isolados de solo destes Biomas brasileiros e tendo sido previamente reportado para outros microrganismos queratinolíticos (15, 37, 39).

Isolamos bactérias com atividade proteolítica, tendo uma média na relação halo/crescimento, a 37 °C, de 1,3 para o isolado Q34 até 3,8 para o isolado P3. Pillai (34) obteve relações de 1,28 a 15 °C, 1,34 a 37 °C e de 1,42 a 50 °C utilizando a bactéria queratinolítica *B. subtilis* isolada de fontes termais de Mumbai, Índia. Porém, a capacidade de degradação das penas dos nossos isolados não teve tanto destaque, já que em 11 dias ainda foi possível observar fragmentos das bárbulas das penas, enquanto que outros microrganismos como o *Microbacterium* sp. kr10 degradam completamente as penas dentro de 48 horas (6).

Foi obtida grande variação na hidrólise visual das penas e produção de proteína solúvel. Algumas características das penas podem interferir na sua degradação como dureza, concentração de pigmentos, degradação por parasitas, idade e sexo dos indivíduos (26). Porém, as penas com as quais trabalhamos eram provenientes de indústria avícola onde sugere-se que tais diferenças estruturais sejam muito pequenas, não interferindo nas variações encontradas. Para melhor avaliar a atividade queratinolítica e potencial aplicação biotecnológica destes isolados, testes com azoqueratina, substrato específico para queratina, deverão ser realizados.

Bactérias Gram-positivas já foram reportadas como representando uma importante parte das comunidades microbianas do solo (41) e como sendo grandes produtoras de

proteases (15). A grande prevalência no isolamento de bactérias queratinolíticas do gênero *Bacillus* já foi grandemente reportada, tanto com métodos tradicionais (6, 44, 47, 48, 50) quanto com métodos moleculares para detecção de bactérias não cultiváveis. Shawkey et al. (42) analisou comparativamente o isolamento baseado em métodos moleculares e o isolamento baseado em cultivos de microrganismos queratinolíticos. Em seu trabalho, obteve predominância de *Bacillus* nos cultivos e a presença deste gênero nas análises moleculares, mas com predominância do gênero *Pseudomonas*. Neste trabalho, também observamos a prevalência do gênero *Bacillus* e o não crescimento em AFP dos isolados amazônicos identificados como *Pseudomonas* sp. Também não foi isolado nenhum actinomiceto como o *Streptomyces*, mais um gênero bastante citado como queratinolítico (6, 17, 45), provavelmente devido às condições do isolamento que não permitiram a obtenção de microrganismos de crescimento lento.

Muitos trabalhos reportam isolados do cluster *B. subtilis* como possuindo grande potencial queratinolítico (13, 22, 29, 44), alguns tendo grande potencial como depilatórios na indústria de curtume como o isolado de solo *B. subtilis* S14 (27) e outros já tendo sua queratinase comercializada como aditivo em rações animais sob o nome de Versazyme®, enzima esta proveniente do isolado de um biodigestor de resíduos avícolas, *B. licheniformis* PWD-1 (50). *B. licheniformis* também vem sendo predominantemente observado na microbiota das penas de aves selvagens, provavelmente adquirido no contato com o solo (9, 51).

Um número menor de trabalhos apresenta isolados do cluster *B. cereus* como queratinolíticos (14, 16). Zaghloul et al. (47) em isolamento de bactérias queratinolíticas de solo do Egito obteve os gêneros *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. pumilus*. Pissuwan e Suntornsuk

(35) isolaram bactérias queratinolíticas do solo de Taiwan e obtiveram o *B. sphaericus* como o melhor degradador de penas, seguido por *B. cereus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*.

Os gêneros *Aeromonas* e *Serratia* pertencem ao grupo das Gram negativas δ -Proteobacteria, que possui poucas bactérias queratinolíticas estudadas como a *Xanthomonas maltophila* (10), *Lysobacter* sp. (1) e *Stenotrophomonas* sp. (48). Lucas et al. (26) estudando a diversidade de microrganismos degradadores de penas do solo de uma região temperada da Suíça isolou uma *Serratia fonticola*, que apresentou baixa atividade queratinolítica. Já o isolado de resíduos de indústria avícola *Vibrio* sp. (39), também da família Vibrionaceae, apresentou grande potencial queratinolítico.

Há um grande número de proteases descritas para *Aeromonas* de origem tanto clínica como ambiental (40). *Aeromonas* produzem uma ampla variedade de proteases que causam danos a tecidos lhes permitindo a invasão e estabelecimento de infecções sobressaindo-se às defesas do hospedeiro, tendo espécies deste gênero conhecidas como patógenas oportunistas de animais de sangue quente e animais de sangue frio (33). Não há estudos prévios sugerindo uma atividade queratinolítica para este gênero.

Já o gênero *Serratia* possui espécies conhecidas como causadoras de doenças oportunistas de origem alimentar podendo formar colônias em várias superfícies do trato gastrointestinal de insetos e vertebrados. Muitas espécies do gênero produzem enzimas proteolíticas extracelulares, o que vem sendo relacionado como seu principal fator de virulência (31).

Diferentemente deste, os trabalhos que obtiveram bactérias queratinolíticas Gram negativas foram realizados em locais com grande quantidade de resíduos de queratina, sendo tanto em solos com rejeitos de indústrias avícolas (37, 39), quanto em solos onde

havia sido previamente incubadas as penas para posterior isolamento (26). Nossa coleta não teve nenhum enriquecimento prévio à coleta, que pode ter sido refletido numa baixa na diversidade.

Realizamos coletas em solos de mata nativa e incluímos no estudo as bactérias de solo amazônico. Sugere-se que os solos brasileiros, principalmente o da Amazônia, tenham um potencial para a bioprospecção de microrganismos biotecnologicamente interessantes ainda pouco explorado (4, 30), além de ser portadora de uma enorme biodiversidade ainda pouco estudada (5). Dentre nossos isolados, os amazônicos se destacaram quanto à atividade queratinolítica. Giongo et al. (13) também reportou produção de queratinases para espécies de *Bacillus* isolados de peixes da Amazônia.

Este estudo corroborou com trabalhos mais recentes que apresentam a capacidade de degradação de penas também para as bactérias Gram negativas. Mas também nos mostrou, mais uma vez, a prevalência do gênero *Bacillus* entre isolados queratinolíticos, que além de serem mais abundantes, apresentam uma maior capacidade enzimática. O gênero *Bacillus* deve ter um papel efetivo na reciclagem de resíduos queratinolíticos, mas esta capacidade não está restrita a eles na natureza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Ana Paula Folmer e Daniel Joner Daroit pelas importantes contribuições ao trabalho; ao Luis Fernando da Costa Medina, Renata Voltolini Velho, Andréa Tollini Thomas e Adriana Ambrosini pelos auxílios na identificação molecular dos isolados; à Jaslin A. S. Taffarel pela participação em quase todas as etapas realizadas; ao Guilherme Dubal dos Santos Seger pelo companheirismo e ao CNPq pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allpress, J.D.; Mountain, G.; Gowland, P.C. (2002). Production, purification, and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. *Let. Appl. Microbiol.* 34, 337–342.
2. Bernal, C.; Cairó, J.; Coello, N. (2006a). Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *EnymesMicrobial. Technol.* 38, 49-54.
3. Bernal, C.; Diaz, I.; Coello, N. (2006b). Response surface methodology for the optimization of keratinase production in culture medium containing feathers produced by *Kocuria rosea*. *Can. J. Microbiol.* 52, 445-450.
4. Bastos, E.R.A; Moon, D.H.; Rossi, A.; Trevors, J.T.; Tsai, S.M. (2000). Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Arch. Microbiol.* 174, 346–352.
5. Borneman, J.; Triplett, E.W. (1997). Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population shifts Associated with Deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2647-2653.
6. Brandelli, A. (2008). Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioprocess Technol.* 1, 105-116.
7. Bradbury, J.H. (1973). The structure and chemistry of keratin fibers. *Adv. Prot. Chem.* 27, 111-211.
8. Bressolier, P.; Letourneau, F.; Urdaci M.; Verneuil, B. (1999). Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 111-211.

9. Burt, E.H.; Ichida, J.M. (1999). Occurrence of feather-degrading Bacilli in plumage of birds. *Auk*. 116, 364–372.
10. De Toni, C.H.; Richter, M.F.; Chagas, J.R.; Henriques, J.A.; Termignoni, C. (2002). Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. *Can. J. Microbiol.* 48, 342-348.
11. Geimba, M.P.; Tondo, E.C.; De Oliveira, F.A.; Canal, C.W.; Brandelli, A. (2004). Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *J. Food Protec.* 67 (6), 1229-1233.
12. Giovanni, S.J.; Rappé, M. (2000). Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In: DL Kirchman (ed) *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss, 47–84.
13. Giongo, J.L.; Lucas, F.S.; Casarin, F.; Heeb, P.; Brandelli, A. (2007). Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 375–382.
14. Ghorbel, B.; Sellami-Kamoun, A.; Nasri, M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme Microbial. Technol.* 32(5), 513-518.
15. Ghosh, A.; Maity, B.; Chakrabarti, K.; Chattopadhyay, D. (2007). Bacterial diversity of east Calcutta wet land area: Possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. *Microb. Ecol.* 54, 452–459.
16. Ghosh, A.; Chakrabarti, K.; Chattopadhyay, D. (2008). Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 825-834.

17. Gupta, R.; Rammani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 21–33.
18. Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 41, 95-98.
19. Holt, J.G. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology- Gram-positive Bacteria other than Actinomycetes*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 1^a ed.(2).
20. Holt, J.G.; Krieg, N.A.; Snath, P.H.A.; Staley, J.T. (2000). *Bergey's of Manual Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.10^a ed.
21. Kaul, S. e Sumbali, G. (1997). Keratinolysis by poultry farm soil fungi. *Mycopathologia*. 139, 137-140.
22. Kim, J.M.; Lim, W.J.; Suh, H.J. (2001). Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process. Biochem.*, 37, 287-291.
23. Lin, X.; Inglis, G.; Yanke, L.; Cheng, K.J. (1999). Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 149-153.
24. Lisboa, M.P.; Bonatto, D.; Bizani, D.; Henriques, J.A.P.; Brandelli, A. (2006). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *Intern. Microbiol.* 9, 111-118.
25. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
26. Lucas, F.S.; Broennimann, O.; Febbraro, I.; Heeb, P. (2003). High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. *Microb. Ecol.* 45, 282-290.

27. Macedo, A.J.; Da Silva, W.O.B.; Gava, R.; Driemeier, D.; Henriques, J.A.P.; Termignoni, C. (2005). Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 594–596.
28. MacFaddin, J.F. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, M.D.
29. Manczinger, L.; Rozs, M.; Vágvolgyi, Cs.; Kevei, F. (2003). Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9(1), 35-39.
30. Motta, A.S.; Cladera-Olivera, F.; Brandelli, A. (2004). Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. *Braz. J. Microbiol.* 35, 307–310.
31. Mozhina, N.V.; Burmistrova, O.A.; Pupov, D.V.; Rudenskaya, G.N., Dunaevsky, Ya.E.; Demiduk, I.V.; Kostrov, S.V. (2008). Isolation and properties of *Serratia proteamaculans* 94 Cysteine Protease. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 34 (3), 274–279.
32. Papadopoulos, M.C.; El Boushy, A.R.; Roodbeen, A.E.; Ketelaars, E.H. (1996). Effects of processing time and moisture content on aminoacid composition and nitrogen characteristics of feather meal. *Anim. Feed Sci. Tech.* 14, 279-290.
33. Pemberton, J.M.; Kidd, S.P.; Schmidt, R. (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 1-10.
34. Pillai, P.; Archana, G. (2008). Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 643-650.

35. Pissuwan, D.; Suntornsuk, W. (2001). Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated in Thailand. *Kasetsart J. (Natural Science)*. 35, 171–178.
36. Pospiech, A.; Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 11 (6), 217-218.
37. Riffel, A.; Brandelli, A. (2002) Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 255-258.
38. Riffel, A.; Brandelli, A. (2006). Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Braz. J. Microbiol.* 37, 395-399.
39. Sangali, S.; Brandelli, A. (2000). Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. kr2 strain. *J. Appl. Microbiol.* 89, 735-743.
40. Santos, J.A.; González, C.J.; López-Díaz, T.M.; García-López, M.L.; Otero, A. (1996). Extracellular protease production by dairy strains of *Aeromonas hydrophila* as affected by growth media and incubation temperature. *Food Microbiol.* 13, 47–51.
41. Sessitsch, A.; Weilharter, A.; Gerzabek, M.H.; Kirchmann, H.; Kandeler, E. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4215–4224.
42. Shawkey, M.; Mills, K.L.; Dale, C.; Hill, G.E. (2005). Microbial Diversity of wild bird feathers revealed through culture-based and culture-independent techniques. *Microb. Ecol.* 50, 40-47.
43. Shih, J.C.H. (1993). Recent development in poultry waste digestion and feather utilization- A review. *Poultry Sci.* 72, 1617-1620.

44. Suh, H.J.; Lee, H.K. (2001). Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *J. Protein Chem.* 20, 165–169.
45. Szabo, L.; Benedek, A.; Szabo, M.L.; Barabas, G. (2000). Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 252–255
46. Thys, R. C. S.; Lucas, F. S.; Riffel, A.; Heeb, P.; Brandelli, A. (2004). Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 181-186.
47. Zaghloul, T.I.; Al-Bahra, M.; Al-Azmeh, H. (1998). Isolation, identification, and keratinolytic activity of several feather-degrading bacterial isolates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70-72, 207- 213.
48. Zerdani, I.; Faid, M.; Malki, A. (2004). Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. in Morocco. *Afr. J. Biotechnol.* 3 (1), 67-70.
49. Yamamura, S.; Morita, Y.; Hasan, Q.; Yokoyama, K.; Tamiya, E. (2002). Keratin degradation: A cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 1138- 1143.
50. Williams, C.M.; Richter, C.S.; MacKenzie, J.M.; Shih, J.C.H. (1990) Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1509-1515.
51. Whitaker, J.M.; Cristol, D.A.; Forsyth, M.H. (2005). Prevalence and genetic diversity of *Bacillus licheniformis* in avian plumage. *J. Field Ornithol.* 76(3), 264–270.