

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS- UNISINOS  
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA:  
DIVERSIDADE E MANEJO DE VIDA SILVESTRE  
MESTRADO

ANGÉLICA PEUKERT SILVEIRA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Lysobacter* sp. ISOLADA DE PENAS DE PINGUINS  
DA ILHA DE REI GEORGE, ANTÁRTICA**

SÃO LEOPOLDO

2012

Angélica Peukert Silveira

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Lysobacter* sp. ISOLADA DE PENAS DE  
PINGUINS DA ILHA DE REI GEORGE, ANTÁRTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Biologia (Diversidade e Manejo da Vida Silvestre) da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando da Costa Medina

SÃO LEOPOLDO

2012

S587a Silveira, Angélica Peukert.  
Atividade enzimática de lysobacter sp. isolada de penas  
de pinguins da Ilha de Rei George, Antártica / Angélica  
Peukert Silveira. – 2012.  
50 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Rio  
dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2012.  
"Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando da Costa Medina."

1. Queratina. 2. Degradação. 3. Enzima. 4. Bactéria. I. Título.

CDU 57

Catálogo na publicação: Bibliotecário Flávio Nunes - CRB 10/1298

Angélica Peukert Silveira

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Lysobacter* sp. ISOLADA DE PENAS DE  
PINGUINS DA ILHA DE REI GEORGE, ANTÁRTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Biologia (Diversidade e Manejo da Vida Silvestre) da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS.

Aprovado em 28 do mês de fevereiro de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luis Fernando da Costa Medina- Universidade do Vale do Rio dos Sinos- UNISINOS.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidia Mariana Fiuza - Universidade do Vale do Rio dos Sinos- UNISINOS.

---

Prof. Dr. Daniel Joner Daroit- Universidade Federal da Fronteira do Sul – UFFS.

*Dedico a meus carinhosos e amados pais:*

*Ari e Nadir.*

## Agradecimentos

Existem situações em nossas vidas que é fundamental poder contar com o apoio e a ajuda de algumas pessoas. Para a realização desta pesquisa, pude contar com várias. E a essas pessoas prestarei, em poucas palavras, os mais sinceros agradecimentos:

A minha família: a meus carinhosos pais pelo incentivo, apoio, compreensão, auxílio, carinho, amor e por acreditar que isso seria possível. Ao meu irmão Guilherme Peukert Silveira e a minha cunhada Gilvana Menegol, pela alegria. Ao meu namorado Douglas Casagrande, pelo apoio, carinho e paciência. A minha dinda Ana Inez Klein pelas horas de conversa, incentivo, carinho, proteção e conselhos. Vocês fazem parte da minha vida, ajudaram-me a crescer, me dão forças, palavras de incentivo e vontade de sorrir! A grandeza está nas ações! Vocês sempre serão o meu maior presente!

À Deus, por ter permitido que alcançasse mais esse objetivo em minha vida, por ter me oportunizado concluir mais essa etapa, ajudando e dando-me forças sempre que necessário para que não parasse de lutar em nenhum instante;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Fernando da Costa Medina pela oportunidade, conhecimento e orientação;

A oportunidade de ter trabalhado na área de Biologia Molecular e Microbiologia, até então pouco conhecida por mim. Pela oportunidade desse projeto, pela pesquisa, pelo aprendizado;

A todos do laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da UNISINOS: funcionários, bolsistas e colegas pelos momentos de conversa, aprendizagem, auxílio, colaboração, amizade e “dramas” compartilhados. Em especial: Carine von Mülhen, Diouneia Berlitz, Fernanda Zardo, Irene Olkoski, Guilherme Cauduro, Michele Pittol e Milena Passaia;

A todos os colegas de Mestrado em Biologia, em especial: Cristiane Forgiarini, Daniele Uarte de Matos, Denise Peresin, Leonardo Urruth, Renata Dal Corno, Simone Oliveira e Juliana Bohnenberger;

Ao professor Adriano Brandelli por ceder o espaço em seu laboratório para realizar os experimentos;

Aos colegas de laboratório do ICTA-UFRGS. Em especial: Ana Paula Folmer, Karla Perez, Taís Dufau de Vargas, Indjara Mallmann, Carlos Waltrick, Michele Utpott e Jamile Queiroz.

De forma especial as colegas: Fernanda Zardo, Jamile Queiroz e Michele Utpott pela grande ajuda durante o mestrado, paciência e amizade;

À professora Maria Virginia Petry por ter realizado a coleta do material na Antártica;

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidia Mariana Fiuza e ao Prof. Dr. Daniel Joner Daroit pela disponibilidade e por ter aceitado o convite para participar da banca examinadora desta dissertação;

Ao Santander pela bolsa de estudo fornecida;

Aos meus amigos (as), que de uma forma ou de outra participaram dessa conquista, estando presente mesmo em pensamento nos momentos em que mais precisava, escutando-me sempre que necessário, aconselhando-me, apoiando-me;

À coordenação, professores e funcionários do curso PPG Biologia da UNISINOS;

Agradeço a todos que de alguma forma acrescentaram e fizeram a diferença na concretização desse trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

*“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio.*

*Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes. Por que o ter consciência não nos obriga a ter sobre as coisas; só nos obriga a sermos conscientes.*

*Problemas para vencer, liberdade para provar.*

*E, enquanto acreditamos em nosso sonho, nada é por acaso.”*

*(Henfil)*



## RESUMO

Micro-organismos queratinolíticos são encontrados em diversos ambientes, já havendo sido descritos diversos fungos e bactérias. Entre as enzimas microbianas que vem ganhando destaque estão as queratinases, responsáveis pela degradação da queratina. O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar micro-organismos produtores de queratinases a partir de penas em decomposição provenientes de pinguins (*Pygoscelis antarctica* e *Pygoscelis papua*) da Ilha Rei George, Antártica. O cultivo dos micro-organismos foi realizado em placas de ágar farinha de pena (AFP) a temperatura ambiente ( $\pm 25$  e  $8$  °C) e posteriormente, foram armazenadas na geladeira ( $8$  °C). Os micro-organismos selecionados foram identificados a partir de análises moleculares, através da obtenção da sequência do gene 16S do rDNA. Para avaliação inicial do potencial proteolítico, os isolados foram inoculados no meio Ágar leite (AL) e incubados por 7 dias nas temperaturas de  $8$  °C, por uma semana, a  $25$  °C e  $37$  °C, por até 48 horas, sob os pH's 5,0, 7,0, 9,0 e 11,0. Aqueles capazes de formar halos em AL foram selecionados para os testes enzimáticos sob o substrato de caldo farinha de pena (CFP). Para a determinação da atividade queratinolítica foi utilizado o substrato azoqueratina. O isolado identificado através do gene 16S como *Lysobacter* sp. foi capaz de crescer no meio AFP como única fonte de carbono e nitrogênio e apresentou também a formação de halos em AL e, produzindo queratinases quando inoculado no meio CFP e incubado  $8$  °C e  $20$  °C, pH 7,0. Este é um dos primeiros trabalhos a confirmar a existência de bactérias produtoras de proteases queratinolíticas no Ambiente Antártico, as quais mostram-se ativas nas faixas de temperaturas abaixo de  $25$  °C.

**Palavras-chave:** Queratina. Degradação. Enzima. Bactéria

## ABSTRACT

Keratinolytic micro-organisms are found in diverse environments, having already been described between fungi and bacteria. Among the microbial enzymes that have been gaining prominence are the keratinases, responsible for the keratin degradation. The aim of this study is to isolate and to identify micro-organisms producing keratinases from decomposing feathers of penguins (*Pygoscelis antarctica* and *Pygoscelis papua*) from King George Island, Antarctica. The cultivation of micro-organisms was performed on Ágar feather meal plates at room temperature ( $\pm 25$  °C and 8 °C) and, afterwards, they were stored in the refrigerator (8 °C). The selected micro-organisms were identified through molecular analysis, by obtaining the sequence of the gene 16S from rDNA. For an initial assessment of the proteolytic potential, the isolates were inoculated on milk-agar (MA) and incubated for 7days at 8 °C for one week, at 25 °C and 37 °C for up to 48 hours, on pH's 5,0,7,0, 9,0 and 11,0. Those able to form halos on MA were selected for enzyme tests on feather meal broth substrate. For keratinolytic determination azokeratin substrate was used. The isolate identified through gene 16S as *Lysobacter* sp. was capable of growing on agar feather meal as the sole carbon and nitrogen source, and it showed the formation of halos on MA, and produced keratinase when inoculated on feather meal broth substrate and incubated at 8 °C and 20 °C, pH 7.0. This is one of the first studies to confirm the existence of keratinolytic protease producing bacteria in the Antarctic environment, which are active in temperatures below 25 °C.

**Key words:** Keratin. Degradation. Enzyme. Bacteria

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Localização esquemática da Ilha Rei George. Situa-se nas coordenadas 62°05'0"S 58°23'28"W (A), arquipélago das Shetlands do Sul (B), Ilha Rei George (C) aonde se localiza a Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz". (Ministério da Educação, 2007)..... 16**
- Figura 2: Fragmento de aproximadamente 1.500 pb correspondente ao gene 16S rDNA de colônias bacterianas isoladas de amostras de penas de pinguins da Ilha de Rei George, no verão de 2009/2010. Eletroforese em gel de agarose a 1 %..... 34**
- Figura 3: Árvore filogenética construída no programa MEGA 5.0, a partir do método de Neighbor -joining usando Jukes-Cantor..... 35**
- Figura 4: Atividade proteolítica demonstranda a medida do halo (mm) em Ágar leite com (pH 5,0) a 8 °C durante 168 horas..... 37**
- Figura 5: Atividade proteolítica demonstranda a medida do halo (mm) em Ágar leite com (pH 5,0) a 25 °C durante 24 horas..... 37**
- Figura 6: Atividade proteolítica demonstrando a medida do halo (mm) em Ágar leite com (pH 5,0) a 37 °C durante 24 horas..... 38**
- Figura 7: Atividade queratinolítica extracelular durante o cultivo da linhagem *Lysobacter* sp. 3 em caldo de farinha de penas nas temperaturas de 8 e 20 °C..... 40**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1: Atividade proteolítica em placas de AL (pH 7,0) com as seguintes linhagens: *Lysobacter* sp. 1, *Lysobacter* sp. 2, *Lysobacter* sp. 3 E *Bacillus* sp. P 45. As placas foram incubadas a com temperatura de 8 °C durante uma semana (168 horas), ±25 °C e 37 °C (24 horas)..... 36**

## SUMÁRIO

1.	JUSTIFICATIVA.....	14
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1.	ANTÁRTICA .....	15
2.2.	MUDANÇAS AMBIENTAIS NA ANTÁRTICA.....	17
2.3.	MICRO-ORGANISMOS NA ANTÁRTICA .....	18
2.4.	GÊNERO <i>Lysobacter</i> .....	19
2.5.	MICRO-ORGANISMOS QUERATINOLÍTICOS .....	20
2.6.	QUERATINAS E QUERATINASES.....	21
3.	OBJETIVOS.....	22
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
4.	CAPÍTULO 1.....	23
5.	INTRODUÇÃO .....	25
6.	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
6.1	LOCAL E COLETA .....	27
6.2.	FARINHA DE PENA.....	27
6.3.	MEIOS DE CULTURA .....	28
6.4.	MICRO-ORGANISMOS .....	28
6.5.	ESTOQUE DO MICRO-ORGANISMO .....	29
6.6.	IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS .....	29
6.7.	IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA .....	31
6.8.	PRODUÇÃO DA ENZIMA .....	31
6.9.	ENSAIO ENZIMÁTICO.....	32

<b>6.10. ANÁLISE DOS DADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>7.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS .....</b>	<b>33</b>
<b>7.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....</b>	<b>34</b>
<b>7.3. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....</b>	<b>36</b>
<b>7.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....</b>	<b>39</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>9. AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>41</b>
<b>10. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>
<b>11. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>46</b>
<b>12. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>46</b>
<b>13. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## 1. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, tem crescido o interesse no emprego de enzimas produzidas por micro-organismos como uma alternativa para o processamento de resíduos como o farelo de trigo, casca de arroz e penas, gerados anualmente pela indústria na ordem de milhares de toneladas. A indústria avícola produz uma grande quantidade de penas com potencial para causar impacto ambiental, pois se acumulam como resíduo após o processamento das aves para consumo humano (Onifade et al., 1998). No entanto, as penas possuem cerca de 87% de proteína (Bureau et al., 1999) em forma de queratina (Riffel et al., 2003).

Entre as enzimas microbianas que vêm ganhando destaque estão as queratinases, responsáveis pela degradação da queratina, uma proteína insolúvel que confere rigidez às penas das aves. Essas enzimas podem aumentar a digestibilidade de penas e da farinha de pena utilizada como insumo em rações animais. Micro-organismos queratinolíticos, produtores de queratinases são encontrados em diversos ambientes, já havendo sido descritos, entre fungos e bactérias, várias linhagens com tal propriedade. Estes organismos, em sua maioria, requerem temperaturas elevadas para a produção enzimática.

Vários projetos com micro-organismos vêm sendo desenvolvidos no Programa Antártico Brasileiro- PROANTAR, entre eles: estudos em relação à sensibilidade destes micro-organismos à radiação ultravioleta (Piquet et al. 2010), bactérias degradadoras de poluentes químicos como organoclorados (PCBs) e hidrocarbonetos, e outras que indicam a poluição de origem fecal (Ministério do Meio Ambiente, 2007). Alguns desses organismos e /ou suas enzimas são aplicados nas indústrias para a produção de rações, processamento de couro (Onifade et al., 1998).

Assim, o estudo de enzimas e micro-organismos de um ambiente extremo pode ampliar o conhecimento acerca das adaptações bioquímicas para a atividade à baixa temperatura, sendo de relevância tanto para o meio acadêmico bem como de interesse para as indústrias.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. ANTÁRTICA

As regiões mais frias da Terra são o Ártico e a Antártida. O continente Antártico possui uma área de cerca de 14 milhões de quilômetros quadrados, sendo maior do que a Austrália ou o sub-contidente da Europa. O continente é coberto em cerca de 95 %, por uma grossa camada de gelo, que varia entre 2.200 m a 4.800 m de espessura, e se caracteriza por apresentar baixas temperaturas (média de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Apesar destas características possui uma diversidade de organismos e nichos ambientais, incluindo diferentes tipos de solo, sedimentos, rochas, neve, bem como gelo (Russell, 2006).

As ilhas Shetland do Sul são um grupo de ilhas Antárticas a cerca de 120 Km da península. A Ilha Rei George é a maior e mais setentrional das Shetland do Sul. Aproximadamente 93 % de seus 240 Km<sup>2</sup> são cobertos por gelo (Mollet al., 2005). O caráter insular e a posição geográfica lhe conferem um clima marítimo, úmido e frio (Mcknight & Hess, 2000) (Figura. 1. B).

As condições mais amenas das ilhas oceânicas do norte da Península, entre as quais se insere a Ilha Rei George, em relação aos climas extremamente frios e secos do Continente Antártico, propiciam ecossistemas mais diversificados e dinâmicos (Inoue, 1991; Francelino, 2004).

Na Ilha Rei George, localiza-se a Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz" (Figura 1. A e C). Nessa região, o Programa Antártico Brasileiro realiza pesquisas desde 1983, o que proporcionou ao País a possibilidade de tornar-se membro pleno do Tratado da Antártica, que reúne um grupo seleto de países responsáveis pelo futuro do chamado "Continente Branco". O Programa Antártico Brasileiro, o PROANTAR é resultado da soma de esforços de diversos órgãos do governo federal, reunidos pela Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM). Fazem parte da comissão os Ministérios da Defesa, das Relações Exteriores, do Meio Ambiente, da Ciência e Tecnologia, das Minas e Energia, da Educação, entre outros (Ministério do Meio Ambiente, 2007).



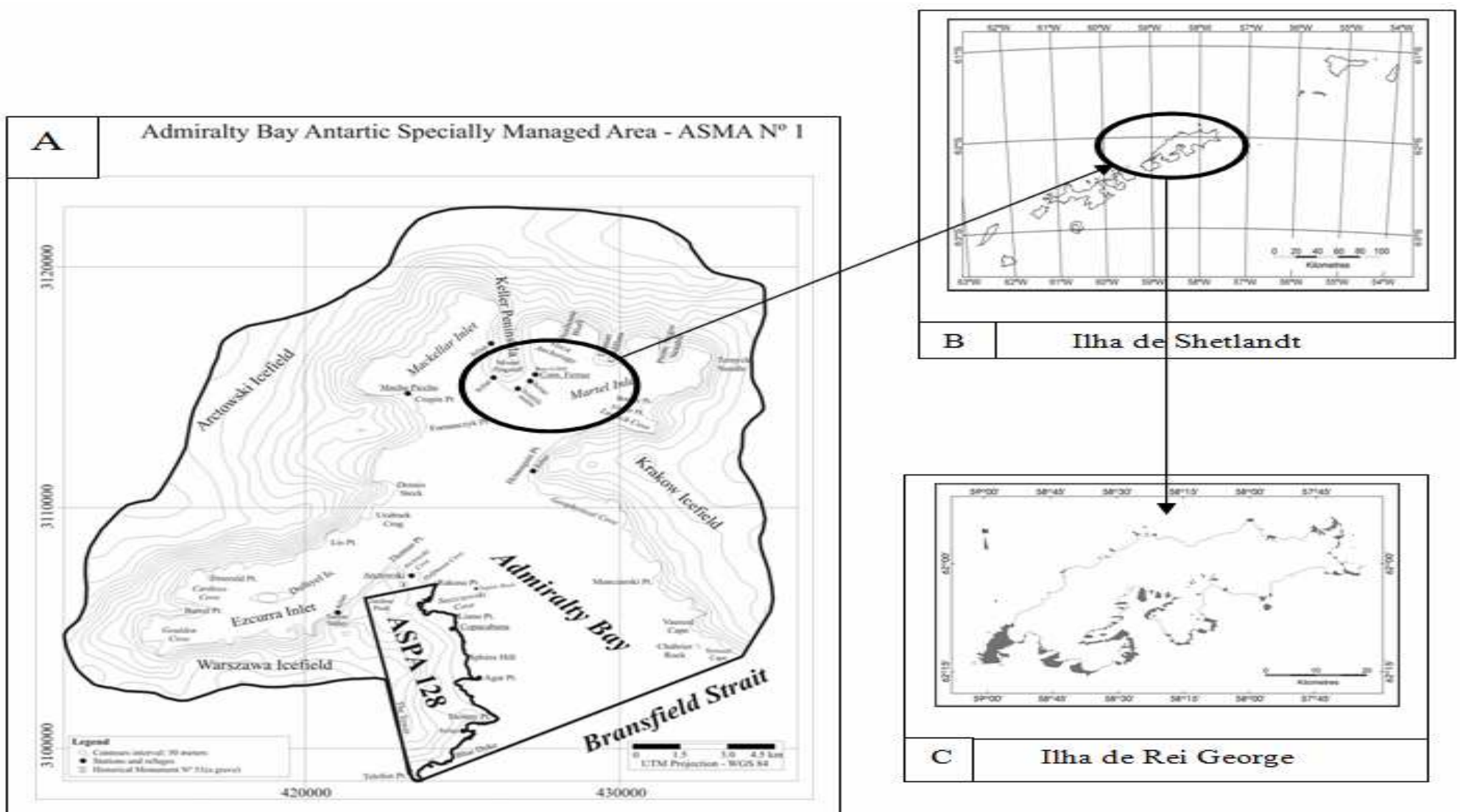


Figura 1: Localização esquemática da Ilha Rei George. Situa-se nas coordenadas  $62^{\circ}05'0''\text{S}$   $58^{\circ}23'28''\text{W}$  (A), arquipélago das Shetlands do Sul (B), Ilha Rei George (C) aonde se localiza a Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz" (Ministério da Educação, 2007).

## 2.2. MUDANÇAS AMBIENTAIS NA ANTÁRTICA

Nos últimos 50 anos, os registros meteorológicos indicaram um avanço na temperatura atmosférica quatro vezes maior do que a média mundial, sendo que a Antártica é uma região sensível a essas mudanças globais. Associado a este aumento de temperatura, a ilha perdeu 7 % da cobertura de gelo, sendo que foram as maiores perdas já observadas no planeta com a destruição de aproximadamente 7.000 Km<sup>2</sup>. Destacando-se que nos últimos oito anos, 350 Km foram somente da Ilha de Rei George. Estas observações apontam que, conseqüentemente com a perda da cobertura do gelo, ocorreu perda de organismos nunca antes estudados. Isto aponta a sensibilidade ambiental da região, conscientizando-se que esta é uma área especial onde é possível detectar com antecedência respostas do ambiente às mudanças globais (IAPA, 2008).

### 2.3. MICRO-ORGANISMOS NA ANTÁRTICA

Segundo o trabalho de Don A. Cowan et al. (2004), os micro-organismos da Antártica são encontrados em diferentes habitats, entre eles:

#### - Vales secos

Os vales secos são os desertos mais frios, apresentando condições ambientais adversas: baixa temperatura, baixa umidade, alto teor de sal, ventos e baixo teor de matéria orgânica que impõem grandes limitações na sobrevivência e crescimento microbiano. A sobrevivência de micro-organismos em solos minerais dependem do seu estado de nutrição, sua compatibilidade com o soluto, a sua habilidade para mudar o seu metabolismo para capturar crioprotetores. Além disso, esses micro-organismos são submetidos ao estresse osmótico devido a altas concentrações de sais, cálcio, magnésio, cloreto de sódio, sulfato e nitrato;

#### - Solos minerais

A maioria dos micro-organismos isolados de solos minerais são psicrotróficos, sendo mais abundantes na camada de *permafrost*, onde as temperaturas são mais baixas. Entre eles destacam-se as leveduras: *Cryptococcus consortionis*, *C. lupi*, *C. socialis*, *C. vishniacii* e *Leucosporidium*. E os fungos: *Monodictys austrina*, *Chrysosporium verrucosum*, *Acrodontium antarcticum*, *Chalara antarctica*, *Phialophora dancoii* e *Thelebolus microsporus*;

#### - Solos ornitogênicos:

Os solos ornitogênicos são solos modificados pela presença de aves, sendo ambientes únicos em habitats microbianos, pois possuem elevados níveis de nutrientes, nitrogênio, fósforo e carbono. O exame microscópico de solos ornitogênicos tem mostrado até 50 % da microbiota como Gram-negativos e cocos, embora apenas uma porção baixa dos tipos de células seja cultivável. Várias novas espécies do gênero *Psychrobacter* foram isoladas. Até o momento nenhuma análise filogenética da distribuição microbiana em solos ornitogênicos foi relatada.

Outra pesquisa realizada pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo investiga os micro-organismos pertencentes aos domínios Bacteria e Archaea na Baía do Almirantado. Algumas destas bactérias estudadas são indicadores microbiológicos de

poluição como, por exemplo, bactérias que indicam a poluição de origem fecal e bactérias degradadoras de poluentes químicos: hidrocarbonetos e organoclorados (PCBs). Micro-organismos pertencentes ao domínio Archaea, podem sobreviver a condições extremas de temperatura, salinidade e pH, são predominantes no ambiente antártico, mas ainda foram pouco estudadas pela dificuldade de cultivo. Os resultados desta pesquisa demonstram que os micro-organismos pertencentes aos domínios Bacteria e Archaea permitem avaliar o que foi alterado e qual é a capacidade de recuperação desse ambiente (Ministério do Meio Ambiente, 2007).

Pesquisas com bactérias da Antártica representam uma oportunidade para descobrir espécies novas, que podem ser úteis em inúmeras áreas da ciência, tais como: na produção de antibióticos e compostos eficientes no tratamento de câncer. Outro ponto importante é que tal estudo também ajuda a entender os processos ecológicos no ambiente antártico que, na grande maioria das vezes, é dominado por micro-organismos, sendo que estão presentes no mar, na terra e na neve. Há ambientes, como o interior do continente antártico, onde os únicos seres vivos capazes de sobreviver são fungos e bactérias (Iamarino, 2011).

#### **2.4. GÊNERO *Lysobacter***

O gênero *Lysobacter* foi primeiramente descrito por Christensen & Cook (1978), como micro-organismos com um alto conteúdo de G + C. Recentemente três novas espécies do gênero foram descritas *Lysobacter koreensis* (Lee et al., 2006), *Lysobacter daejeonensis* e *Lysobacter yangpyeongensis* (Weon et al., 2006), isoladas de amostras de solo.

O gênero *Lysobacter* pertence à família Xanthomonadaceae dentro da gama de proteobactérias. No momento o gênero *Lysobacter* é composto por 13 espécies com nomes validamente publicados: *Lysobacter enzymogenes* (Christensen & Cook, 1978), *L. antibioticus* (Christensen & Cook, 1978), *L. brunescens* (Christensen & Cook, 1978), *L. concretionis* (Bae et al., 2005), *L. daejeonensis* (Weon et al., 2006), *L. gummosus* (Christensen & Cook, 1978), *L. koreensis* (Lee et al., 2006), *L. yangpyeongensis* (Weon et al., 2006), *L. defluvii* (Yassin et al., 2007), *L. niabensis* (Weon et al., 2007), *L. niastensis* (Weon et al., 2007), *L. spongiicola* (Romanenko et al., 2008) e *L. capsici* (Park et al., 2008).

Conforme Hayward et al. (2010), representantes do gênero *Lysobacter* podem ser isoladas de solos, água doce, habitats enriquecidos com quitina, cogumelos e células. Porém, muito pouco se sabe sobre a ecologia desse gênero em solos, algumas evidências sugerem que a incidência da mesma é influenciada pelo tipo de solo, cobertura vegetal e fatores sazonais (Yin et al., 2008).

Segundo Christensen (2002), a distribuição desse representante é maior do que até então se conhece, incluindo a ocorrência em ambientes extremos, sendo encontrada em sedimentos do mar profundo na Antártica (Aislabie et al., 2009).

## 2.5. MICRO-ORGANISMOS QUERATINOLÍTICOS

Micro-organismos queratinolíticos têm sido muito estudados devido à aplicação de suas enzimas no potencial industrial para o processamento do couro, produção de rações e tratamento e aproveitamento de resíduos da indústria avícola (Onifade et al., 1998). Apresentando um amplo espectro nas relações industriais, apresentando valores potencias na bioconversão de resíduos queratinosos, nas indústrias de detergente, fertilizantes, biopolímeros, farmacêutica e na indústria de rações animais, bem como no processo de couro e na hidrólise de príons (Gupta & Ramnani, 2006; Brandelli, 2008).

A pesquisa de Gioppo, em 2009, relata a identificação e a caracterização de fungos filamentosos capazes de degradar queratina. Sendo eles: *Aspergillus fumigatus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *A. oryzae*, *A. tamarii*, *A. ochraceus*. Os resultados apontam para o gênero *Aspergillus* como um importante degradador de queratina, sendo que neste trabalho ocorreu à primeira descrição de *A. clavatus* como organismo degradador de queratina.

O potencial biotecnológico dos micro-organismos extremófilos tem merecido uma atenção cada vez maior, pois estes são considerados soluções viáveis para os problemas ecológicos e/ou econômicos e biotecnológicos de diversos processos industriais, não só devido aos seus metabolismos muito extremos, mas devido às próprias enzimas que produzem, as quais possuem muitas vezes propriedades com enorme potencial biotecnológico (Félix, 2008).

Allpress et al. (2002), relatam que *Lysobacter* NCIMB 9497 apresentou alta atividade queratinolítica e que a sua concentração de queratinase extracelular produzida foi máxima após 29 dias de cultivo em meio líquido como tempoem queratina.

## 2.6. QUERATINAS E QUERATINASES

Queratinas são polipeptídeos formados por unidades de aminoácidos, com massa molar média da ordem de 10.000 g/mol, apresentando resíduos de cisteína na proporção de 7 a 20 % do número total de aminoácidos (Onifade, 1998; Yamauchi, 1996). A queratina é uma proteína insolúvel, requerendo a secreção de enzimas extracelulares para que a sua biodegradação ocorra. Esta proteína é o principal componente das epidermes, penas, unhas, pêlos, cascos e escamas. As queratinas foram vitais nos processos adaptativos aos ambientes naturais, atuando como barreira mecânica, estrutural e térmica (Busson et al., 1999).

A queratina não é degradada por enzimas proteolíticas comuns, como tripsina e pepsina, por conter uma grande quantidade de pontes dissulfeto e de hidrogênio, e interações hidrofóbicas (Riffel et al., 2007). Esta proteína é degradada por enzimas específicas, denominadas queratinases, que são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas da queratina e são produzidas por diversos micro-organismos e vegetais (Said & Pietro, 2004). A maioria das queratinases são classificadas como serina proteases, em função do substrato e inibidores, sendo que alguns micro-organismos apresentam atividade específica para aminoácidos hidrofóbicos ou aromáticos (Brandelli, 2008).

A evolução no estudo das enzimas (por volta de 1960), acompanhado por avanços tecnológicos, possibilitou o isolamento e a identificação de propriedades das enzimas. Desde então, vem sendo feita a caracterização e o estudo das enzimas de diferentes fontes: animais, vegetais e de micro-organismos (Kieling, 2002).

Devido ao interesse da aplicação industrial destas enzimas o foco mais recente é o de clonar e expressar estas enzimas em linhagens bacterianas industriais de alta produção. O problema da expressão de enzimas heterólogas nestas cepas é o baixo rendimento observado se comparado a linhagens selvagem, sendo associado a características tanto do organismo hospedeiro, quanto as características da enzima (Radha & Gunasekaran, 2007), transformando

isso em um grande desafio para que as pesquisas futuras encontrem enzimas que possam ser altamente expressas em linhagens industriais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo geral isolar micro-organismos de fragmentos de penas em decomposição de pinguins da Ilha de Rei George (Antártica) e identificá-los como organismos degradadores de queratina.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar micro-organismos de penas em decomposição de *Pygoscelis antarctica* (Pingüim antártico) e *Pygoscelis papua* (Pingüim papua) da Ilha de Rei George, Antártica;
- Identificá-los através do gene rDNA 16S;
- Verificar a atividade proteolítica dos micro-organismos obtidos com diferentes substratos;

## 4. CAPÍTULO 1

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Lysobacter* sp. ISOLADA DE PENAS DE PINGUINS DA ILHA DE REI GEORGE, ANTÁRTICA**



## ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Lysobacter* sp. ISOLADA DE PENAS DE PINGUINS DA ILHA DE REI GEORGE, ANTÁRTICA

Silveira, Angélica Peukert<sup>1</sup>; Brandelli, Adriano<sup>2</sup>; Petry, Maria Virginia<sup>3</sup>; Medina, Luis

Fernando da Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia molecular e microbiologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia – UNISINOS. Av. Unisinos, 950 – B. Cristo Rei, CEP 93.022-000, São Leopoldo, RS, Brasil. E-mail ([aangelicaa86@hotmail.com](mailto:aangelicaa86@hotmail.com)).

<sup>2</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, ICTA/UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43212. CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos, Programa de Pós- Graduação em Biologia – UNISINOS. Av. Unisinos, 950 – B. Cristo Rei, CEP 93.022-000, São Leopoldo, RS, Brasil.

---

### Resumo

Os micro-organismos desempenham um papel fundamental no funcionamento e na estrutura dos ecossistemas, sendo poucos conhecidos, onde diversas espécies realizam alterações bioquímicas reciclando elementos e nutrientes na água, equivalente ao descrito para solo. Os micro-organismos podem ser encontrados em todos os lugares, já tendo sido descritos em comunidades bacterianas que vivem nas profundezas do oceano junto a fontes termais, o que ocorre em profundidades de mais de 3600 metros sob a camada de gelo do lago Volstok, na Antártica. Entre as enzimas microbianas que vem ganhando destaque estão as queratinases, responsáveis pela degradação da queratina, uma proteína insolúvel que confere rigidez às penas das aves. O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar micro-organismos produtores de queratinases a partir de penas em decomposição provenientes de pinguins da Ilha Rei George, Antártica. As amostras de penas em decomposição das espécies de pinguim *Pygoscelis antarctica* e *Pygoscelis papua* foram coletadas aleatoriamente com auxílio de pinças estéreis, acondicionadas em tubos estéreis e mantidas sob refrigeração (4 °C). O cultivo dos micro-organismos foi realizado em placas de ágar farinha de pena (AFP) a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C) e posteriormente foram armazenadas na geladeira (8 °C). Os micro-organismos selecionados foram identificados a partir de análises moleculares, através da obtenção da sequência do gene 16S do rDNA e busca por sequências homólogas com o auxílio da ferramenta BLAST no *GenBank*. A atividade enzimática foi conduzida por incubação durante sete dias a temperatura de 8 °C (geladeira) e 20 °C. Sendo coletadas

amostras do cultivo de 12 em 12 horas. O sobrenadante foi utilizado com o substrato de azoqueratina e a amostra foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Para a avaliação do potencial proteolítico, as linhagens isoladas em AFP foram inoculadas em placas com o meio ágar leite (AL) e com diferentes pHs ajustados (5, 7, 9 e 11), e incubadas a temperaturas de 8 °C, por uma semana, a 25 e 37 °C, por até 48 h. O isolado identificado através do gene 16S como *Lysobacter* sp. (Proteobacteria) foi capaz de crescer no meio AFP como única fonte de carbono e nitrogênio. Apresentou a formação de halos em AL e produziu queratinases quando inoculado no meio CFP e incubadas 8 e 20 °C, pH 8,0, como verificado nos ensaios com azoqueratina, apresentando pico de produção enzimática entre 24 e 48 h. O gênero *Lysobacter* sp. demonstrou ter um alto potencial de degradação de queratina tendo atividade ótima em pH 7,0 e 8,0, na temperatura de 20 °C. Conclui-se que este é um dos primeiros trabalhos a confirmar a existência de bactérias produtoras de proteases queratinolíticas no Ambiente Antártico.

**Palavra-chave:** Micro-organismo. Queratina. Degradação. Protease. Antártica.

## 5. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são encontrados ubiquamente, já tendo sido relatados exemplos de comunidades bacterianas vivendo nas profundezas do oceano junto a fontes termais, em temperaturas acima do ponto de ebulição da água (Karl, 1995) até em profundidades de mais de 3.600 metros, sob a camada de gelo do lago Vostok, na Antártica (Price, 2000).

A microbiota desempenha um papel fundamental na estrutura e funcionamento dos ecossistemas, sendo pouco conhecida a diversidade existente (Gasol & Duarte, 2000). Nichols et al. (2002) estimam que somente 1 a 10 % das espécies de bactérias tenham sido descritas até hoje, principalmente através de métodos cultura-dependentes, os quais levam a uma subestimativa da diversidade microbiana que é incapaz de crescimento sob condições de laboratório. Diversas espécies de micro-organismos realizam alterações bioquímicas reciclando elementos e nutrientes na água, da mesma maneira descrita para o solo (Pelczar et al., 1996)

A presença de micro-organismos tem sido usada como bioindicador para o monitoramento e restauração de habitats (Haines et al., 2002). Essas restaurações podem estar relacionadas à comunidade microbiana, agindo como decompositores em habitats degradados, reciclando nutrientes para outros organismos. Além disso, a bioprospecção de micro-organismos de ambientes extremos representa uma oportunidade para a descoberta de novas espécies, com potencial de utilização em diversas áreas da ciência, desde a produção de antibióticos a antitumorais.

Marx et al. (2006) demonstraram várias adaptações de enzimas de micro-organismos Antárticos em comparação com micro-organismos mesófilos, discutindo como conseguem aumentar a eficiência das reações, incluindo a degradação de biopolímeros. Por outro lado, a indústria de alimentos vem se interessando por enzimas que tenham atividade a baixas temperaturas, pois processos como maturação de carnes podem ser otimizados com a presença destas enzimas (Delbarre et al., 2006).

Os avanços biotecnológicos e, em especial o emprego de enzimas, tem causado um expressivo impacto em diferentes setores industriais e os micro-organismos são uma importante fonte de enzimas, apresentando inúmeras vantagens, como diversidade, facilidade de obtenção, características como atividade em diferentes condições de temperatura, pH e salinidade (Onifade et al., 1998; Gupta & Ramnani, 2006).

Entre os micro-organismos queratinolíticos isolados e caracterizados, vários são fungos saprófitos que parasitam a pele humana, sendo de interesse médico (Papini et al., 1996; Sharma et al., 2011) e bactérias, a maioria Gram-positivas do gênero *Bacillus* (Willians et al., 1990; Zaghoul, et al., 1998; El-refai, et al., 2005). Apesar disto, bactérias Gram-negativas com atividade queratinolítica também foram relatadas, porém em menor diversidade de espécies e cepas (Lucas et al., 2003). As bactérias Gram-negativas degradadoras de queratina *Vibrio* sp. (Sangali, et al., 2000), *Xanthomonas maltophilia* (De Toni, et al., 2002), *Stenotrophomonas* sp. (Zardani, et al., 2004) e *Cryseobacterium* sp. (Riffel, et al., 2002), estão entre as linhagens descritas.

O presente trabalho teve como objetivo isolar micro-organismos de fragmentos de penas em decomposição de pinguins da Ilha de Rei George (Antártica) e identificá-los como organismos degradadores de queratina. Os isolados foram identificados através do

sequenciamento do gene rRNA 16S, a nível de gênero e posteriormente foi avaliada a atividade enzimática desses micro-organismos.

## **6. MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1. LOCAL E COLETA**

Amostras de penas em decomposição de *Pygoscelis antarctica* (Pingüim antártico) e *Pygoscelis papua* (Pingüim papua) foram coletadas na Ilha Rei George (62°05'0"S, 58°23'28"W), onde se localiza a Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz". A temperatura média anual é de - 2,8 °C, sendo que no verão, a média é de 0,9 °C e, no inverno, -7 °C. A umidade relativa média é superior a 80 % e a precipitação anual é de 500 mm, podendo ultrapassar 1.000 mm nas partes altas da calota.

As coletas foram realizadas próximas à estação, pela professora e pesquisadora da UNISINOS Prof. Dra. Maria Virginia Petry, no verão de 2009/2010. As penas foram coletadas aleatoriamente, em estado de degradação, nas colônias onde se encontravam os pingüins, em ninhos sobre o gelo, areia ou terra. As amostras foram coletadas com auxílio de pinças estéreis e acondicionadas em tubos estéreis e posteriormente mantidas sob refrigeração (4 °C).

### **6.2. FARINHA DE PENA**

Foram utilizadas como componente do meio de cultura farinha de pena de frango. As penas de frango foram cedidas em lotes de 2 kg por uma empresa avícola local (Avipal, Porto Alegre, RS). A farinha de pena utilizada como componente do meio de cultura 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.

A farinha de pena foi triturada em moinho. Em seguida, tratada com éter de petróleo, à temperatura ambiente por 24 horas para a remoção da gordura. Este material foi então filtrado em papel filtro comum e lavado com água destilada, sendo após seco em temperatura ambiente, em capela de exaustão.

### **6.3. MEIOS DE CULTURA**

Os meios de cultura utilizados foram: AFP- Ágar farinha de pena (Ágar: 2 g, farinha de pena: 1 g, água destilada: 100 mL), CFP: caldo Farinha de pena (1g de farinha de pena, 100 mL de água destilada), AL: Ágar leite (Peptona: 1,25 g, extrato de levedura: 0,75 g, ágar 3 g, água destilada: 225 mL e leite desnatado UTH: 25 mL, sendo que o mesmo foi adicionado após a autoclave, pois o leite “talha”), BHA: Ágar cérebro coração (3,7 g de BHA para 100 mL de água destilada), TSA: Tryptone Soy Ágar (3,7 g de TSA para 100 mL de água destilada), caldo TSB: Tryptone Soy Broth (3,7 g de TSB para 100 mL de água destilada).

Os meios de cultura depois de preparados foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C. O pH do meio foi ajustado, conforme necessário, com NaOH (1N) ou HCl (1N).

### **6.4. MICRO-ORGANISMOS**

Os micro-organismos foram isolados em placas de Ágar farinha de pena (AFP). Nas placas de Petri com o meio de cultura de AFP foi semeado o material coletado (pena de pingüins) repetidas vezes, essas placas foram observadas diariamente. Depois de apresentarem diferentes colônias de bactérias, as mesmas foram isoladas em novas placas e assim sucessivamente, até isolamento completo deste micro-organismo. Essas foram mantidas em diferentes temperaturas, inicialmente à temperatura ambiente  $\pm 25$  e a 8 °C até apresentar crescimento, e posteriormente armazenadas na geladeira (8 °C).

Os materiais e meios de cultura utilizados para a obtenção e manipulação das culturas bacterianas foram preparados sob condições de assepsia e, todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical.

## 6.5. ESTOQUE DO MICRO-ORGANISMO

As culturas foram mantidas em placas de AFP a 8 °C. Periodicamente (a cada 7 dias) essas culturas eram inoculadas em novas placas de APF e TSA e incubadas a temperatura ambiente por 24 horas. O estoque foi feito através do cultivo em caldo TSA, contendo 250 µL de glicerol 60 % (60 mL de glicerol e 40 mL de água destilada) e 750 µL do cultivo em caldo de TSA, sendo armazenado em tanque de nitrogênio líquido à temperatura de - 20 °C.

## 6.6. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos selecionados foram identificados baseados em análise molecular (através da obtenção da seqüência do gene 16S do RNA ribossômico). O gene marcador amplamente utilizado para procariotos é o RNA da pequena subunidade ribossomal (16S rRNA). Essa molécula foi escolhida por apresentar algumas peculiaridades, tais como a sua distribuição universal e a intercalação de regiões altamente conservadas com outras altamente variáveis, permitindo a comparação de organismos dentro do mesmo domínio, bem como a sua diferenciação de linhagens da mesma espécie. O tamanho da seqüência do gene é grande o suficiente para gerar dados que possam ser comparados estatisticamente, além da aparente ausência de transferência genética lateral (Amann, 1990; Gutell et al., 1994; Amann et al., 1995).

**Extração de DNA bacteriano:** Para a extração foi seguido o protocolo modificado de Sambrook et al., (1989). Primeiramente se precipita 1,5 mL da amostra em caldo TSB (colônia isolada), lavando-a em água milli-Q e repetindo esse procedimento no mínimo três vezes. Centrifuga-se a 10.000 rpm por 5 minutos. Transferi-se para tubos Eppendorf de 2mL adicionando 700 µL de tampão de extração (8,4 ml de NaCl – 5M; 3 ml de Tris- HCl com o

pH 8,0 e de 1 M; 1,2 ml de EDTA com pH 0,8 e 0,5 M; 0,3 g de Polivinilpivolidona (PVP 40); 0,6 g de CTAB; 16,5 ml de água milli-q) agitar bem e acrescentar 20 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol. Esta mistura foi incubada por 30 minutos a 65 °C em banho-maria, homogeneizando suavemente a cada 10 minutos. Após a adição de 700  $\mu$ L de CIA (Clorofórmio) homogeneizada até a formar uma emulsão (20 vezes). Esta foi então centrifugada a 5.000 rpm durante 10 minutos e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Esse procedimento foi repetido duas vezes. À fase aquosa adiciona-se o mesmo volume de isopropanol 100 % (etanol absoluto) gelado e, em seguida esta solução foi centrifugada a 12.000 rpm durante 20 minutos e desprezar o sobrenadante. Precipita-se o DNA com 1mL de etanol 70 % após centrifuga a 10.000 rpm, durante 5 minutos. Foi desprezado o sobrenadante e invertido o tubo sobre papel toalha, deixando secar por aproximadamente 20 minutos, ressuspendendo o pellet em 30  $\mu$ L água milli-Q.

**Amplificação por PCR:** O fragmento do gene 16rRNA ( $\pm$  1.500 pares de bases) do DNA bacterino extraído foi amplificado, utilizando-se os primers 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') e MHR1 (5'CCTTGTTACGACTTCACCC – 3'). A reação de amplificação foi constituída por 12,5  $\mu$ L Master MIX Fermentas (Tampão, DNTP'S, MgCl<sub>2</sub>, Taq); 1  $\mu$ L de cada Primer; e 6,5  $\mu$ L água ultra-pura (Milli- Q Millipore) esterilizada para um volume final de 25  $\mu$ L. Todas as amplificações foram realizadas no Termociclador (PTC-100 ProGrammable Thermal Controller). A otimização para algumas amostras foi realizada utilizando as seguintes condições de amplificação: 94 °C por 4 minutos (desnaturação inicial); 94 °C por 1'; 54 °C por 1'; 72 °C por 2'; repetindo o segundo ciclo 29 vezes; 72 °C (extensão final); finalizando a 4 °C.

**Purificação:** Os produtos de PCR (20  $\mu$ L) foram purificados utilizando 2,2  $\mu$ L acetato de amônio 7 M gelado. Em seguida, os eppendorffs com esse conteúdo foram agitados em vórtex por 15 segundos e centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionados 125  $\mu$ L de etanol 70 %, à temperatura ambiente. Após centrifugando por 5 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante descartado e o *pellet* submetido a 50 °C, por 40 minutos. Em seguida foram adicionados ao *pellet* 15  $\mu$ L de água Milli-Q.

Após a extração de DNA, amplificação por PCR do gene 16S RNA e a purificação, as amostras 5  $\mu$ L foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1 %, corado com brometo de etídeo (0,3 mg/mL), a 90 V, por 30 minutos, em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Kodak® Electrop Horesis

Documentation and Analysis System - 120) . As imagens foram fotodocumentadas utilizando o programa 1D Digital Science, versão 2.0.3 (Kodak® Scientific Imaging Systems).

Alíquotas de 10 µL do produto de PCR, de cada amostra purificada, e 1 µL de cada *primer* a 10 pmoles, foram encaminhadas para seqüenciamento automático no 3730 XL DNA *Sequencer* pela *Advancing Through Genomics*– MACROGEN (Coréia do Sul), em ambas as direções (direto 27F e reverso MHR1). E outras alíquotas foram encaminhadas para o CBiot/UFRGS, na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda.

Para avaliar a identidade das seqüências confirmadas utilizou-se o BlastN (Basic Local Alignment Search Tool - Nucleotide) (NCBI site - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

## **6.7. IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA**

A determinação da atividade proteolítica das linhagens obtidas foi realizada em teste de formação de halo em placas contendo Ágar leite. As linhagens selecionadas foram inoculadas em placas com diferentes pHs ajustados (5, 7, 9 e 11), e incubadas a temperaturas de 8 °C, por uma semana, a 25 e 37 °C, por até 48 h.

Os halos formados foram medidos com um paquímetro para análise de qual bactéria apresenta uma melhor atividade proteolítica.

## **6.8. PRODUÇÃO DA ENZIMA**

A produção da queratinase foi conduzida por incubação durante sete dias em estufa de agitação (125 rpm) na temperatura de 20 °C e a temperatura de 8 °C. Foram coletadas amostras do cultivo de 12 em 12 horas, sendo então centrifugadas (10.000 rpm por 5') para separação da biomassa celular e substâncias insolúveis. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima para análises de atividade enzimática.



## 6.9. ENSAIO ENZIMÁTICO

A determinação da atividade enzimática foi empregando o substrato azoqueratina e o sobrenadante da cultura. O caldo mineral foi preparado anteriormente com: NaCl: 0,5 g,  $K_2HPO_4$ : 0,3 g,  $KH_2PO_4$ : 0,4 g para 1 litro de água destilada. Em cada erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 50 mL desse meio mineral e 5 g de farinha de pena. Esses erlenmeyer foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Após esse material estar estéril foi inoculado em cada erlenmeyer uma amostra do inóculo, onde foram incubados a 20 °C, em incubadora de agitação orbital (125 rpm) e também na geladeira a 8 °C, por uma semana. Alíquotas de (1µL) dos cultivos foram retiradas de 12 em 12 horas e centrifugadas (10.000 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático.

A reação foi iniciada adicionando-se 100 µL da enzima a 200 µL de tampão Fosfato dissódico, pH 7,0 (solução A: 0,852 g de Fosfato de sódio em 300 mL de água destilada e solução B: 0,276 g de Fosfato Monossódico 1-hidrato em 100 mL de água destilada. Acondiciona a solução B na solução A até o pH desejado), e 100 µL de substrato (azoqueratina 10 mg). Essa mistura foi incubada por 1 hora a 37 °C e a reação foi interrompida adicionando-se 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. Após centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos o sobrenadante, adicionou-se 200 µL de NaOH 1,8 N. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

Uma unidade enzimática é definida como a quantidade da enzima necessária para aumentar absorvância em 0,01 a 450 nm, nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste.

## 6.10. ANÁLISE DOS DADOS

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Excel 2010, demonstrando a relação entre as diferentes amostras, pH's e temperaturas.

As seqüências obtidas foram editadas no programa Bioedit e alinhadas no programa ClustalX. A matriz de dados foi construída com base nas seqüências parciais obtidas do banco de dados do NCBI.

A reconstrução filogenética foi realizada no programa MEGA 5.0 através do método de Neighbor-joining, utilizando-se como modelo evolutivo Jukes-cantor. A confiabilidade dos nós foi determinada a partir de 1000 réplicas de bootstrap.

## **7. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **7.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS**

Diferentes morfotipos cresceram em AFP após incubados por 48 horas à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C). Verificando-se nas placas de AFP os mesmos morfotipos à 8 °C, após uma semana de incubação.

Posteriormente, os três diferentes morfotipos foram mantidos em placas de BHA (8 °C). Os micro-organismos selecionados apresentara-se Gram- negativos, tendo a forma de bastonetes. As linhagens selecionadas foram identificadas baseadas em análises moleculares (através da obtenção da seqüência do gene 16s do DNA ribossômico). Após a amplificação por PCR, na Figura 2, observa-se os aplicons de aproximadamente 1500 pb, correspondentes ao fragmento do gene 16S rDNA em gel de agarose a 1%.

As linhagens selecionadas apresentaram elevada homologia a espécies do gênero *Lysobacter* sp. não sendo possível identificar ao nível de espécie.

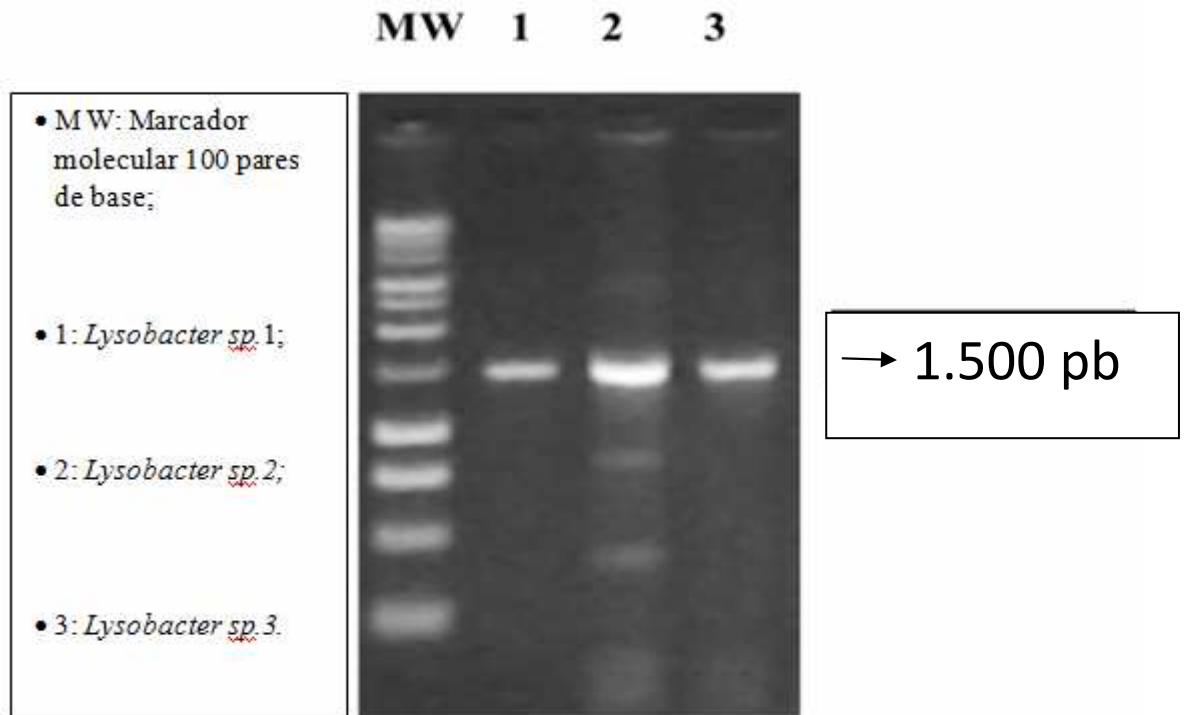


Figura 2: Fragmento de aproximadamente 1.500 pb correspondente ao gene 16S rDNA de colônias bacterianas isoladas de amostras de penas de pinguins da Ilha de Rei George, no verão de 2009/2010. Eletroforese em gel de agarose a 1 %.

## 7.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA

A Árvore filogenética foi construída a partir de Neighbor-joining usando Jukes-Cantor como modelo evolutivo. Os valores nos “nós” são referentes a 1.000 réplicas de Bootstrap representadas por porcentagem (Figura 3).

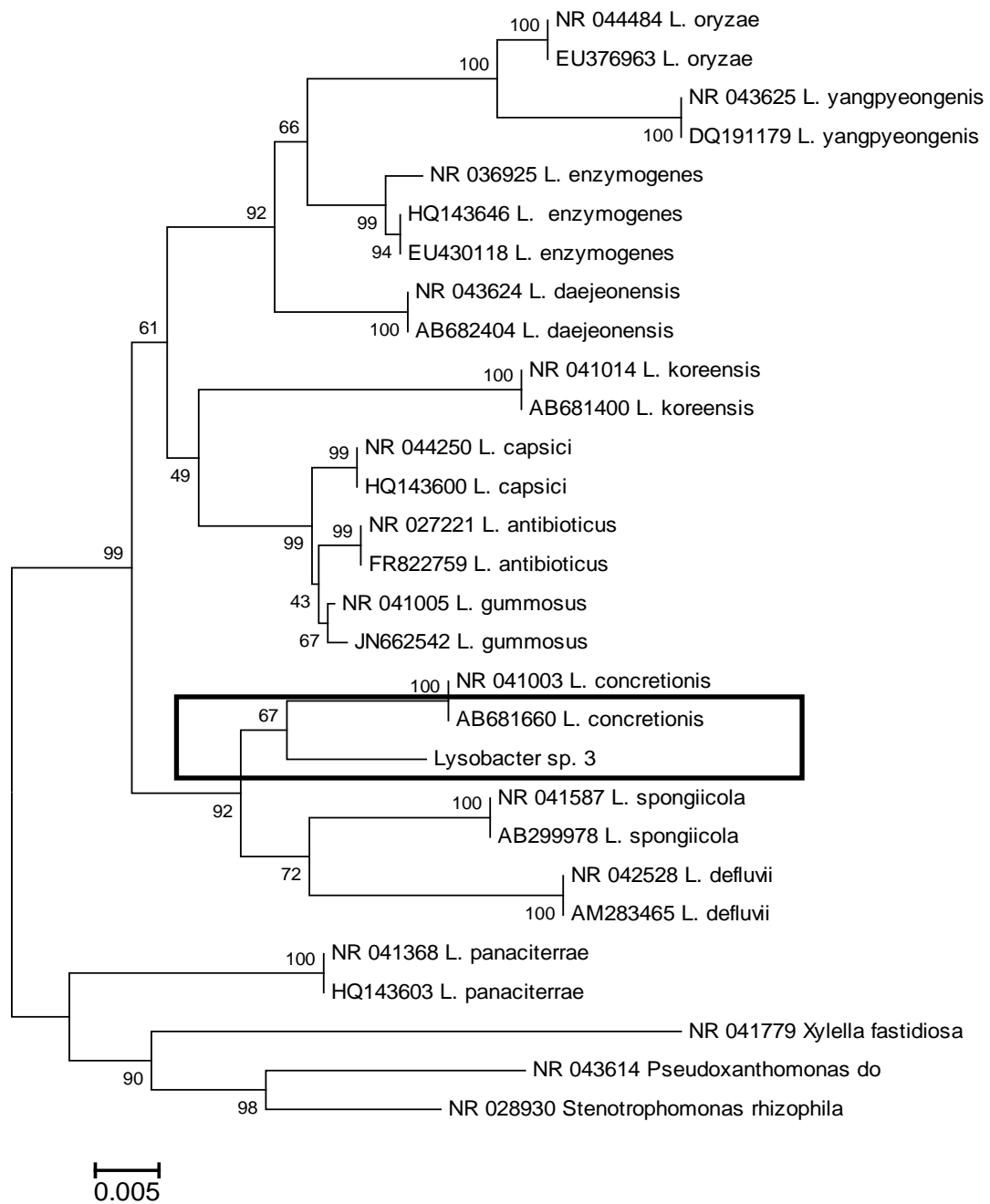


Figura 3: Árvore filogenética construída no programa MEGA 5.0, a partir do método de Neighbor - joining usando Jukes-Cantor.

A topologia recuperada através da reconstrução filogenética demonstrou que o isolado *Lysobacter* sp. 3, pertence ao gênero *Lysobacter*, da família Xhantomonadaceae.

No entanto, dada a baixa confiabilidade do “nó” (67 %) com *Lysobacter concretionis*, não foi possível afirmar a sua identidade específica, sendo necessários mais análises, moleculares para confirmar a sua espécie.

Segundo Bae, et al., 2005, *Lysobacter concretionis* são Gram- negativos e apresentam excelente crescimento em placas de ágar, suas colônias são amarelas, circulares e crescimento ótimo em temperaturas entre 25 – 30 °C.

Como esse micro-organismo é oriundo de ambiente Antártico, e apenas uma pesquisa inclui a ocorrência de *Lysobacter* sp. em ambientes extremos (Aislabie et al., 2009), podemos estar trabalhando com uma espécie totalmente nova.

### 7.3. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Inicialmente foram realizados testes com ágar leite nas temperaturas de 8, 25 e 37 °C, para determinar a atividade proteolítica das linhagens selecionadas. A Tabela 1 mostra que a linhagem *Lysobacter* sp. 3 apresentou maior atividade proteolítica que os demais isolados antárticos *Lysobacter* sp. 1 e *Lysobacter* sp. 2 não foram capazes de formar halo em ágar leite na temperatura de 37 °C, sugerindo que suas enzimas percam atividade nesta temperatura. Além disto, *Lysobacter* sp. 2 não degrada a caseína a temperatura de 25 °C, indicando uma maior sensibilidade da enzima a esta temperatura. Como controle, foi empregado o *Bacillus* sp. P45, acesso no GenBank pelo número AY962474 (Daroit, 2011).

Tabela 1: Atividade proteolítica em placas de AL (pH 7,0) com as seguintes linhagens: *Lysobacter* sp.1, *Lysobacter* sp. 2 , *Lysobacter* sp.3 e *Bacillus* sp. P 45. As placas foram incubadas a 8 °C durante uma semana (168 horas), ± 25 °C e 37 °C (24 horas).

Linhagens	Halos (mm)		
	8 ° C (168h)	25 ° C (24h)	37° C (24h)

<i>Lysobacter sp. 1</i>	0,75	0,5	0
<i>Lysobacter sp. 2</i>	0,5	0	0
<i>Lysobacter sp. 3</i>	1,98	0,72	0,5
<i>Bacillus sp. P45</i>	1,45	0,97	0,43

Nos cultivos em ágar leite com (pH 7,0) na temperatura de 8 °C por 168 horas pode-se observar que *Lysobacter sp. 3* e *Bacillus sp. P 45* foram capazes de formar halo. Isto demonstra que essas linhagens são produtoras de proteases também a temperaturas mais baixas, mas o seu processo é mais tardio (Tabela 1). Devido à maior atividade proteolítica *Lysobacter sp. 3*, somente esta linhagem foi utilizada em estudos subsequentes.

Na temperatura de 8 °C (168 horas) foram realizados experimentos com a linhagem de *Lysobacter sp. 3* no pH 5,0. O halo formado foi de 0,95 mm, por outro lado o halo formado por *Bacillus sp. P45* foi de 1,20 mm. (Figura 4). Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e obtidas através de paquímetro.

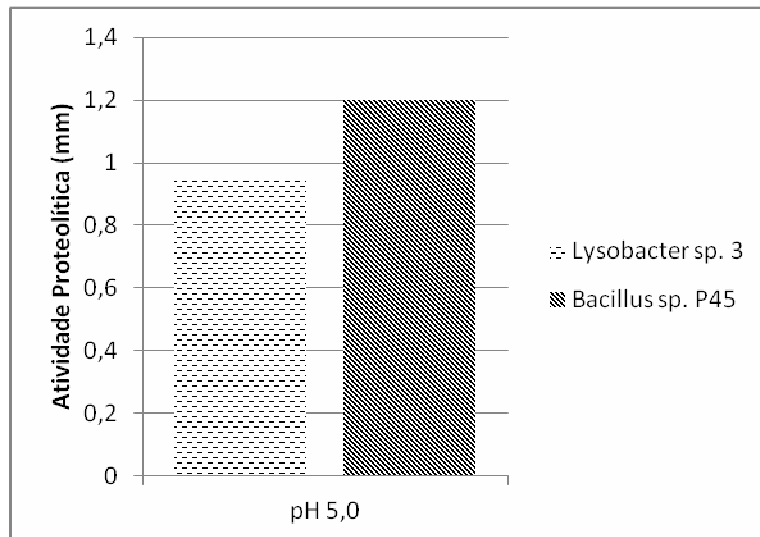


Figura 4: Atividade proteolítica demonstrada a medida do halo (mm), após cultivo em Ágar leite (pH 5,0) a 8 °C durante 168 horas

A Figura 5, apresenta os dados da atividade proteolítica de *Lysobacter* sp. 3 na temperatura de 25 °C e pH 5,0. Observa-se a formação de halo de 0,62 mm após 24 horas. O halo formado pelo controle *Bacillus* sp. P45 foi de 0,53 mm.

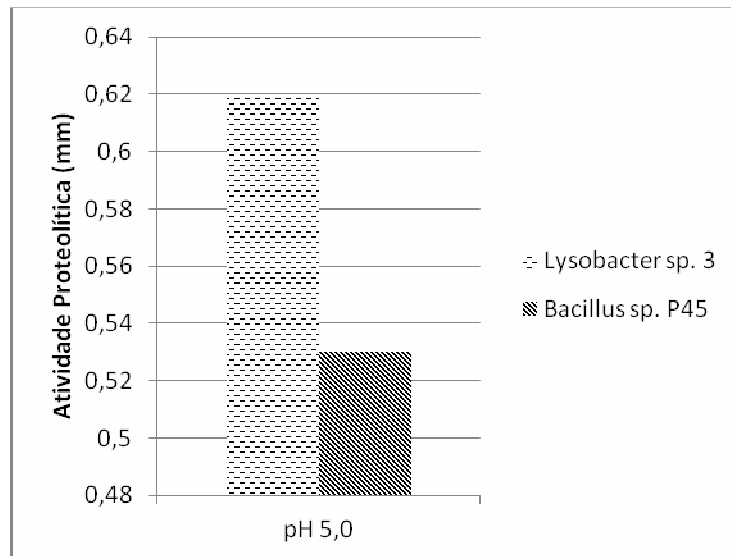


Figura 5: Atividade proteolítica demonstrada a medida do halo (mm), após cultivo em Ágar leite (pH 5,0) a 25 °C durante 24 horas.

Em cultivos da linhagem de *Lysobacter* sp. 3, realizados em placas de AL a 37 °C, pH 5,0 constatou-se a formação de halo de proteólise ao observado em pH 7,0 na mesma temperatura. Os diâmetros dos halos formam de 0,53mm para *Lysobacter* sp. 3 e *Bacillus* sp. P 45 0,58 mm (Figura 6).

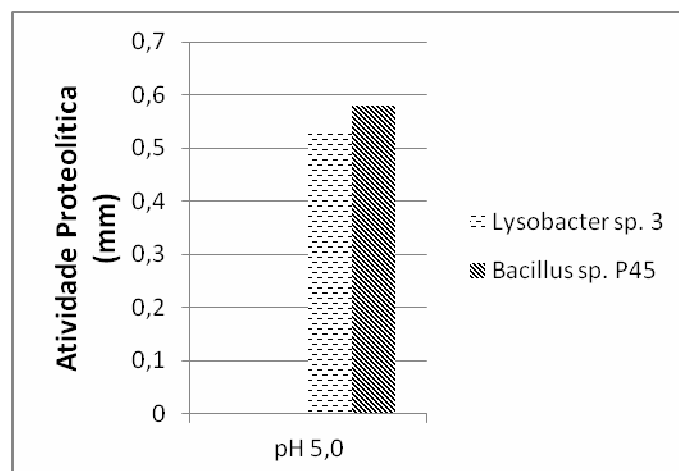


Figura 6: Atividade proteolítica demonstrada através da medida do halo (mm) em Ágar leite (pH 5,0) a 37 °C durante 24 horas.

Thys (2004), determinou em seu trabalho que *Microbacterium* sp. Kr 10 produziu halo de proteólise de aproximadamente 0,4 (mm), após 24 horas em temperatura de 30 °C. Isso comprova a característica proteolíticas do micro-organismo detectada por Riffel & Brandelli (2002). Outro exemplo, é a bactéria *Chryseobacterium* sp. Kr6, isolada a partir de resíduos de aves possui atividade queratinolítica ótima apresentada em pH 8,0 e 30 °C, sua queratinase estava ativa em substratos de azoqueratina e azocaseína e a mesma pode ser isolada de vários ecossistemas, tais como: água, solo, peixes, ambientes marinhos (Riffel, et al., 2003).

Ao avaliar a atividade proteolítica em pHs alcalinos (pH 9,0 e pH 11,0), não foi observado crescimento do isolados *Lysobacter* sp. 3 por issoos dados não formam apresentados.

#### **7.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Para determinar a atividade enzimática foi empregando o substrato azoqueratina e o sobrenadante da cultura (Caldo mineral e farinha de pena). Neste meio mineral foram inculadas amostras de *Lysobacter* sp. 3 e *Bacillus* sp. P 45, e em seguida incubados a 8 e a 20 °C. Alíquotas de (1µL) dos cultivos foram retiradas de 12 em 12 horas e o sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático. A amostra foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

A amostra de *Lysobacter* sp.3 (Figura7) teve maior atividade enzimática à 20 °C , o qual ocorreu no ponto de coleta das 12 à 24 horas. Gupta (2006), confirma em sua pesquisa que o Gênero *Lysobacter* sp. mostrou degradar fortemente a farinha de pena, em pH 8,0 e com temperatura de 20 °C como condições ótimas. A produção de queratinases microbianas são frequentemente induzidas por substratos queratinosos, como penas e farinha de pena.



Ao avaliar a atividade queratinolítica de *Lysobacter* sp. 3 cultivada a 8 ° C, observa-se que a mesma apresentou maior atividade enzimática entre 12 e 24 horas de cultivo. Contudo, a atividade enzimática foi menor que aquela mensurada durante cultivos realizados a 20 °C.

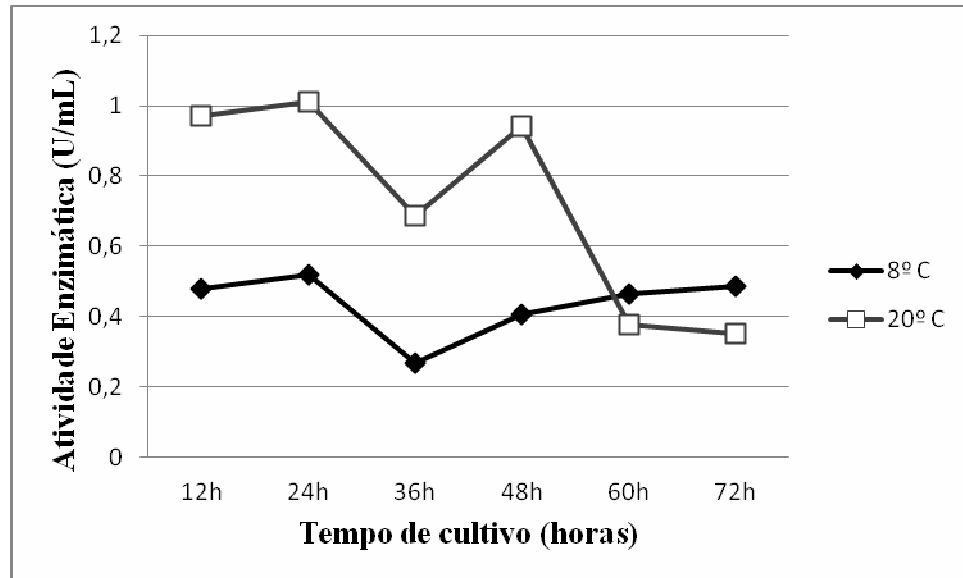


Figura 7: Atividade queratinolítica extracelular durante o cultivo da da linhagem *Lysobacter* sp. 3 em caldo de farinha de penas nas temperaturas de 8 e 20 °C.

Lima et.al., (2009) demonstra em seu trabalho que a indução pelo substrato é o principal mecanismo regulatório para a biossíntese de queratinases. Neste estudo, foram utilizadas 3 espécies: de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. cereus* e avaliada a produção de queratinases utilizando como substrato penas de frango inteiras e farinha de penas. A linhagem de *B. subtilis* mostrou atividade enzimática mais expressiva que as demais espécies de *Bacillus*. As linhagens de bactérias avaliadas apresentaram atividade queratinolítica e percentual de degradação satisfatórios tanto em penas como farinha de penas, sendo mais eficiente em substratos de penas.

Segundo Côrrea (2009), a utilização de farinha de pena como substrato pode resultar em um processo custo–benefício mais eficaz, sendo que a mesma tem sido empregada em outros estudos ( Lucas et al., 2003, Tiquia et al., 2005, Riffel, et al., 2003).

O Gênero *Lysobacter* apresenta atividade enzimática a temperatura de 20 °C, sendo que a 8 °C a atividade enzimática é menor.

Isso sugere que mesmo os organismos oriundos de ambiente extremo, degradam queratina rapidamente a temperaturas mais elevadas do que à baixas. A degradação de

queratina ocorre em ambientes extremos, pois não percebe-se o acúmulo de penas neste local. Conclui-se que as bactérias degradam esse material, porém num período maior.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- O gênero *Lysobacter* demonstrou ter um alto potencial de degradação de queratina;
- Possui atividade ótima em pH 7,0 e 8,0 à temperatura de 20 °C;
- Os micro-organismos a 8 °C são mais lentos quanto a degradação da queratina, do que os que estão a 20 °C, ou seja, os mesmos vieram de um ambiente extremo mas, degradam queratina a temperaturas mais altas;
- Conclui-se que as atividades proteolíticas ocorreram com maior intensidade nas placas de ágar leite com o pH 5,0 e o pH 7,0;
- Este é um dos primeiros trabalhos a confirmar a existência de bactérias produtoras de proteases queratinolíticas no Ambiente Antártico, as quais mostram-se ativas nas faixas de temperaturas abaixo de 25 °C. O potencial biotecnológico desses micro-organismos pode ser muito mais explorado a fim de identificar organismos oriundos de ambiente extremo até o momento tão pouco estudados.

## 9. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Grupo Santander que cedeu-me a bolsa de estudos, a qual foi importante para a minha chegada até aqui, para a conclusão desta pesquisa e de mais este ciclo em minha vida que se encerrou com sucesso. Muito obrigada!

## 10. REFERÊNCIAS

AISSLABIE, J.; JORDAN, S.; AYRTON, J.; KLASSEN, J.L.; BARKER, G.M.; TURNER, S. **Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica.** Journal Canadian of Microbiology. v.55, p. 21-36, 2009.

AMANN, R. I. et al. **Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations.** Applied and Environmental Microbiology, v.6, p.1919-1925, 1990.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.** Microbiology and Molecular Biology Review, v.59, p.143-169, 1995.

BAE, H. S.; IM, W.T.; LEE, S.T. **Lysobacter concretionis sp. nov., isolated from anaerobic granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v. 55, p. 1155–1161, 2005.

CORRÊA, A. P. F. **Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus sp.* P7.** 89 f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado, 2009.

DAROIT, D. J. **Potencial queratinolítico e caracterização de uma queratinase extracelular de *Bacillus sp.* P45.** 168 f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de doutorado, 2011.

DELBARRE, C.. **Trends in Postmortem Aging in Fish: Understanding of Proteolysis and Disorganization of the Myofibrillar Structure.** Critical Reviews Food Science Nutrition. v. 46, p. 409-421, 2006.

DE TONI, C.H.; RICHTER, M.F.; CHAGAS, J.R.; HENRIQUES, J.A.; TERMIGNONI, C.. **Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain.** Canadian Journal of Microbiology. v. 48, p. 342-348, 2002.

EL-REFAI, H. **Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity.** Process Biochemistry. v. 40 p. 2325-2332, 2005.

GASOL, M.G.; DUATRE, C.M. **Comparative analyses in aquatic microbial ecology: how far do they go?** FEMS Microbiology Ecology. v. 31, p. 99-106, 2000.

GUPTA, R.; RAMNAI, P. **Microbial keratinases and their prospective applications: an overview.** Applied Microbiololy and Biotechnology. v. 70, p.21-33, 2006.

GUTELL, R.R.; LARSEN, N.; WOESE, C.R. **Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23SrRNA structures from a comparative perspective.** Microbiology and Molecular Biology Review.v.58, p.10-26, 1994.

HAINES, J.R.; HERRMANN, R. LEE, K. COBANLI, S, BLAISE, C. **Microbial population analysis as a measure of ecosystem restoration.** Biorremed Journal. v .6, n. 3, p. 283-296, 2002.

KARL, D. M. **Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities.** InternationalThe Microbiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents (ed. D. M. Karl), p. 35-125, 1995.

LIMA, M.F.; VERMELLO, A.B.; COURI, S.; SILVA, E.A.; PACHECO, R.N.; DIAS, D.A. **Produção de queratinase por cepas de três espécies de *Bacillus* utilizando penas e farinha de penas como substrato.** Nutrição, Anais do Prêmio Lamas, 2009.

LUCAS, P. **High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil.** FEMS Microbiology Ecology. v. 45, p. 282-290, 2003.

MARX, J. **Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms.** Mar Biotechnology. v.9, p. 293-304, 2006.

ONIFADE, A. **A Review: potentials for biotechnological applications of keratindegrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources.** Bioresource Technology .66, p. 1-11., 1998.

PAPINI, R. **Extracelular enzymatic activity of *Microsporium canis* isolates.** Mycopatholy.v. 132, p. 129-132, 1996.

PELCZAR, J.M.; CHAN, E.C.S. & KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos Básicos e Aplicações.** Volume II, Ed. Makron Books, São Paulo. 517 f., 1996.

PRICE, P.B. **A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice.** PNAS, v.97, p.1247-1251, 2000.

RIFFEL, A., BRANDELLI, A. **Isolation and characterization of a feather degrading bacterium from the poultry processing industry.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. v. 29, p. 255-258, 2002.

RIFFEL, A.; LUCAS, A.; HEEB, P.; BRANDELLI. **A Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin.** Archives of Microbiology.v.179, p.258-265., 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A laboratory manual.** 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. **Feather Keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. Kr2 strain.** Journal Applied Microbiology. v..89, p. 735- 743, 2000.

SHARMA, M; RAO, V.M. **In vitro biodegradation of keratin by dermatophytes and some soil keratinophiles.** African Journal of Biochemistry Research, v. 5, p. 1-6, 2011.

THYS, R. C. S. **Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microorganismo *Microbacterium* sp. kr 10.** 114f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

TIQUIA, S.M.; I. J.M.; K. H.M.; E., D.L.; B. JR., E.H.; M. JR., F.C. **Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes.** Applied Microbiology Biotechnology. v. 67, p. 412-419, 2005.

WILLIAMS, C. **Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium.** Applied and Environmental Microbiology. v. 56, p. 1509-1515, 1990.

ZAGHLOUL, T. **High level of expression and stability of the cloned alkaline protease (*aprA*) gene in *Bacillus subtilis*.** Enzyme and Microbial Technology. v. 16, p. 534-537, 1994.

ZARDANI, I.; FAID, M.; MALKI, A. **Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. In Morroco.** African Journal of Biotechnology. v.3, n.1, p. 67-70, 2004.

## 11. DISCUSSÃO GERAL

Apesar da queratina ser de alta estabilidade, percebe-se que não ocorre acúmulo da mesma na natureza. Confirmando assim, a existência de micro-organismos decompositores naturais capazes de degradar como substrato para o seu crescimento. Esses micro-organismos são chamados de organismos decompositores podendo crescer em diferentes condições ambientais e ecológicas.

Demonstra-se neste trabalho a suma importância de estudar micro-organismos que vivam em ambientes extremos, pois micro-organismos queratinolíticos têm um papel fundamental no nosso meio ambiente para degradação de queratina e outras aplicações.

Poucos estudos descreveram o isolamento de micro-organismos na Antártica, trabalhamos com um micro-organismo que é do gênero *Lysobacter* com potencial queratinolítico, mas muito pouco estudado até o momento.

## 12. PERSPECTIVAS

As próximas etapas do estudo dessa enzima seriam a purificação, caracterização bioquímica e do gene que codifica para a queratinase em *Lysobacter* sp. sendo realizadas para a melhor compreensão e otimização dos mecanismos de produção enzimática, uma vez que tal micro-organismo, adaptado às condições extremas do continente Antártico, oferece uma alternativa para a bioconversão dos resíduos queratinosos.

## 13. REFERÊNCIAS

AI SLABIE, J.; JORDAN, S.; AYRTON, J.; KLASSEN, J.L.; BARKER, G.M.; TURNER, S. **Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica.** Journal Canadian of Microbiology. v.55, p. 21-36, 2009.

ALLPRESS, J. D.; MOUNTAIN, G.; GOWLAND, P. C. **Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497.** Letters in Applied Microbiology. v. 34, p. 337–342, 2002.

BAE, H. S.; IM, W.T.; LEE, S.T. ***Lysobacter concretionis* sp. nov., isolated from anaerobic granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbioly. v. 55, p. 1155–1161, 2005.

BRANDELLI, A. **Bacterial Keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial byproducts and beyond.** Food and Bioprocess Technology.v. 1, p. 105-116, 2008.

BUREAU, D.P.; HARRIS, A.M.; CHO, C.Y. **Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquaculture, v.180, p.345-358, 1999.

BUSSON, B.; ENGSTRÖN, O.; DOUCET, J. **Existence of various structural zones in keratinous tissues revealed by X- ray microdiffraction.** Journal of Synchrotron Radiation, Copenhagen, v.6, p.1021-1030, 1999.

CHRISTENSEN, P.; COOK, F. D. ***Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbioly. v.28, p. 367–393, 1978.

COWAN, D. A.; LEMESE, A., T. **ENDANGERED ANTARCTIC ENVIRONMENTS.** Annual Review Microbiology. v.58, p.649–90, 2004.

FÉLIX, D. J.S. **Potencial biotecnológico dos micro-organismos extremófilos.** 115 f. Dissertação de mestrado, Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, 2008.



FRANCELINO, M. R. **Geoprocessamento aplicado ao monitoramento ambiental da antártica marítima: solos, geomorfologia e cobertura vegetal da península Keller**. 100 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, 2004.

GIOPPO, N.M.R. **Produção de queratinases por fungos filamentosos**. 51 f. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, 2009.

GUPTA, R.; R, P. **Microbial keratinases and their prospective applications: an overview**. Applied Microbioly and Biotechnology. v. 70, p.21-33, 2006.

HAYWARD, A.C.; FEGAN, N.; STIRLING, G.R. **Stenotrophomonas and Lysobacter: ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology**. Journal applied of microbiology. v. 108 , p. 756–770, 2010.

IAMARINO, A. Entrevista sobre a Antártica. Acesso disponível em 8 de outubro de 2011 pelo site [http://scienceblogs.com.br/rainha/2008/03/entrevista\\_antartida.pHp](http://scienceblogs.com.br/rainha/2008/03/entrevista_antartida.pHp)

INOUE, M. **Ecological notes on the differences in flora and habitat of lichens between the Syowa station area in continental Antarctic and King George Island in maritime Antarctic**. Proceedings of the NIPR Symposium on Polar Biology, v. 4, p. 91-106, 1991.

INSTITUTO ANTÁRTICO DE PESQUISAS AMBIENTAIS – IAPA, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia, 59 f. 2008.

KIELING, D. D. **Enzimas, aspectos gerais**. Florianópolis, 2002.

LEE, J. W.; IM, W.T.; KIM, M. K.; YANG, D.C. **Lysobacter koreensis sp. nov., isolated from a ginseng field**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbioly. v. 56, p. 231–235, 2006.

MCKNIGHT, T.L.; HESS, D. **Climate Zones and Types: The Köppen System**”, **Physical GeograpHy: A Landscape Appreciation**. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall, 200 p, 2000.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O Brasil e o Meio Ambiente Antártico**, p.83, 2007.

MOLLET, A.; BRAUN, M.; LUBERAS, A. **Determination of glacier velocities on King George Island (Antarctic Peninsula) by DIFSAR**. In: **FRINGE ATSR WORKSHOP, Frascati, Italy**. Proceedings, European Space Agency, p.469, 2005.

ONIFADE, A. **A Review: potentials for biotechnological applications of keratin degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources**. *Bioresource Technology*. v. 66, p. 1-11, 1998.

PARK, J.H.; KIM, R.; ASLAM, Z.; JEON, C.O.; CHUNG, Y.R. ***Lysobacter capsici* sp. nov., with antimicrobial activity, isolated from the rhizosphere of pepper, and emended description of the genus *Lysobacter***. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol.* v. 58, p. 387–392, 2008.

PIQUET, A. **Seasonal succession and UV sensitivity of marine bacterioplankton at an Antarctic coastal site**. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 115, p.310-315, 2010.

RADHA, S.; G, P. **Cloning and expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain**. *Journal Applied Microbiology*. v. 103, p. 1301-1310, 2007.

RIFFEL, A.; LUCAS, A.; HEEB, P.; BRANDELLI, A **Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin**. *Archives of Microbiology*.v.179, p.258-265, 2003.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. **Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium sp. kr6***. Journal of Biotechnology. v.128, p.693- 703, 2007.

ROMANENKO, L.A.; UCHINO, M.; TANAKA, N.; FROLOVA, G.M. ***Lysobacter spongicola sp.nov.*, isolated from a deep sea sponge**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbioly. v.58, p. 370–374, 2008.

RUSSELL, N.J. **Antarctic micro-organisms: coming in from the cold**. Culture, v. 27, n.2, p. 0965-0989, 2006

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p.413, 2004.

WEON, H.Y.; KIM, B.Y.; BAEK, Y.K.; YOO, S.H.; KWON, S.W.; STACKEBRANDT, E.; GO, S. J. **Two novel species, *Lysobacter daejeonensis sp. nov.* and *Lysobacter yangpyeongensis sp. nov.*, isolated from Korean greenhouse soils**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbioly.. v. 56, p. 947–951, 2006.

WEON, H.Y.; KIM, B.Y.; KIM, M.K.; YOO, S.H., KWON, S.W.; GO, S.J.; STACKEBRANDT, E. ***Lysobacter niabensis sp.nov.*and *Lysobacter niastensis sp. nov.*, isolated from greenhouse soils in Korea**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbioly. v.57, p. 548–551, 2007.

YAMAUCHI, K. et al. **Preparation of steble aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films**. Journal of Biomedical Materials Research, Nem York, v.31, p. 439-444, 1996.

YASSIN, A.F.; CHEN, W.M.; HUPFER, H.; SIERING, C.; KROPPESTEDT, R.M.; ARUN, A.B.; LAI, W.A.; SHEN, F.T. et al. ***Lysobacter defluvii sp. nov.*, isolated from municipal solid waste**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbioly. v.57, p. 1131–1136, 2007.

YIN, H.; CASWELL-CHEN, E. ; YUEN, G.Y. **Isolation and comparison of new *Lysobacter enzymogenes* strains for biological control traits.** *Phytopathology.* v. 98, p. 178., 2008.