



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Ubirajara Samuel de Albuquerque

**DETECÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EM
BACTÉRIAS MESOFÍLICAS ISOLADAS DE LODO DE
ESGOTO, ESTAÇÃO MANGUEIRA, RECIFE,
PERNAMBUCO**

**Recife
2009**

UBIRAJARA SAMUEL DE ALBUQUERQUE

**DETECÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EM
BACTÉRIAS MESOFÍLICAS ISOLADAS DE LODO DE
ESGOTO, ESTAÇÃO MANGUEIRA, RECIFE,
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais
Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Arminda Saconi Messias

**Recife
2009**

A345d

Albuquerque, Ubirajara Samuel de

Detecção de enzimas hidrolíticas em bactérias mesofílicas isoladas de lodo de esgoto, Estação Mangueira, Recife, Pernambuco / Ubirajara Samuel de Albuquerque ; orientador Carlos Alberto Alves da Silva ; co-orientador Arminda Saconi Messias, 2009.

70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2009.

1. Lodo de esgoto. 2. Bactérias mesofílicas. 3. Enzimas microbianas hidrolíticas. I. Título

CDU 628.3

Albuquerque, Ubirajara Samuel

Detecção de Enzimas Hidrolíticas em Bactérias Mesofílicas Isoladas de Lodo de Esgoto, Estação Mangueira, Recife, Pernambuco, 2009, 66p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2009.

1. Lodo de Esgoto. 2. Bactérias Mesofílicas. 3. Enzimas Microbianas Hidrolíticas. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos

DETECÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EM BACTÉRIAS MESOFÍLICAS ISOLADAS DE LODO DE ESGOTO, ESTAÇÃO MANGUEIRA, RECIFE, PERNAMBUCO

Ubirajara Samuel de Albuquerque

Defesa em: ____/____/____

Examinadores:

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva (Orientador)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^a. Dr^a Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^a Dr^a Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
Unidade de Serra Talhada

Prof^a Dr^a Alexandra Salgueiro
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
Coordenadora

A Deus, pela infinita capacidade de me amar sem pedir nada em troca e nos ter auxiliado a transpor as inúmeras dificuldades encontradas ao longo do trabalho.

Aos meus pais (*in memoriam*), pessoas especiais que fizeram a diferença.

Aos meus filhos, sem os quais a vida não teria sentido.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, pela orientação do trabalho, esclarecimento, acolhimento, atenção e muita paciência.

À Prof^a Dr^a Arminda Saconi Messias pela co-orientação prestada.

À Prof^a Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki, pela sua compreensão competência e ética.

À mãe dos meus filhos Maria Ilma e à amiga Maria Inagelma por acreditarem na concretização deste sonho.

Aos colegas de turma, em especial Ednaldo, Fernando Luis e Fabiana América, pela amizade e companheirismo.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S.J., por proporcionar as condições essenciais para a edificação do conhecimento e concretização desta pesquisa.

À Prof^a Dr^a Ana Maria de Melo da Universidade Federal de Pernambuco pela atenção e incentivo a mim dispensado.

À Amanda Emmanuelle Sales, bolsista PIBIC, pela preciosa ajuda nos experimentos práticos laboratoriais.

A todos os professores do Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, pela dedicação que cada qual desempenhou na sua disciplina.

Aos colegas da Escola Duarte Coelho da Cidade de Olinda, em especial à diretora Dionaura Maria da Costa, pelo incentivo e compreensão a mim dispensado durante o curso.

A todos os colegas do Colégio Municipal Fernando Augusto Pinto Ribeiro – Palmares, pelo apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus irmãos Carlos Samuel de Albuquerque, Margareth Samuel de Albuquerque, Marleide Samuel de Albuquerque, Wilsom Samuel de Albuquerque, Abderraman de Albuquerque Junior, Robsom Samuel de Albuquerque, Trebesson Samuel de Albuquerque e Ieda Samuel de Albuquerque (*in memoriam*) pelo incentivo.

A todos os meus sobrinhos que muito torceram pela conclusão deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I	
1.1 Introdução	14
1.2 Objetivos	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2 Objetivos Específicos	16
1.3 Revisão da Literatura	17
1.3.1 Lodo de Esgoto	17
1.3.2 Solo	21
1.3.2.1 Matéria Orgânica do Solo (MOS)	22
1.3.2.2 Metais Pesados no Solo	23
1.3.2.3 Microrganismos do Solo	25
1.3.3 Enzimas Microbianas	26

1.3.4 Enzimas Relacionadas com o Solo.....	27
1.3.5 Enzimas Hidrolíticas.....	30
1.3.5.1 Urease.....	30
1.3.2.2 Amilase.....	31
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO II – Detecção de Amilase e Uréase em Bactérias Mesofílicas Isoladas de Lodo de Esgoto	47
2.1 INTRODUÇÃO	47
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS.....	60
CAPÍTULO III	
CONCLUSÕES GERAIS.....	64
INSTRUÇÕES DA REVISTA BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY.....	68

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Esquema de tratamento de esgotos domésticos	28
Figura 2. Esquema conceitual de um processo físico-químico para remover metais pesados de lodo de esgoto	30

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 Principais enzimas indicadoras da qualidade do solo.....	28
Tabela 2. Nomenclatura das enzimas	30

CAPÍTULO II

Tabela 1. Identificação das bactérias isoladas do lodo de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto da Mangueira, Recife-PE, Brasil.....	61
Tabela 2. Caracterização química (metais pesados) do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE.....	61
Tabela 3. Identificação das bactérias mesofílicas selecionadas e isoladas de lodo de esgoto e amostras tratadas à 28 °C.....	62
Tabela 4. Identificação das bactérias mesofílicas selecionadas e isoladas de lodo de esgoto e amostras tratadas à 37 °C.....	62
Tabela 5. Caracterização química do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE	63
Tabela 6. Detecção de amilase e uréase em amostras de bactérias mesofílicas isoladas à 28 °C.....	63
Tabela 7. Detecção de amilase e uréase em amostras de bactérias mesofílicas isoladas à 37 °C.....	64
Tabela 8. Isolamento e identificação de bactérias mesofílicas isoladas de lodo de esgoto à 28 e 37 °C.....	64

RESUMO

O lodo de esgoto é um sub-produto residuário das empresas de tratamento de águas, apresenta, é um dos principais fatores de remoção de microrganismos patogênicos que chegam com o esgoto ao solo, contaminando esse ambiente muitas vezes de forma irreversível. O processo de mineralização da matéria orgânica é catalisado por diferentes enzimas, em sua composição química uma alta concentração de componentes orgânicos e inorgânicos, que após tratamentos, pode ser utilizado na agricultura, porém a sua aplicação ao solo altera muitas vezes os parâmetros físicos, químicos e biológicos do solo. O solo é um sistema complexo que compreende uma variedade de microhabitats com diferentes gradientes físicos e químicos e condições ambientais descontínuas. A presença de metais pesados no lodo de esgoto, limita a sua utilização nos processos de fertilização do solo, devido ao alto grau de toxicidade através da absorção pelas plantas, que alimentarão os herbívoros, os metais podem entrar na cadeia alimentar, chegando aos consumidores de primeira ordem e ao homem, e o alto índice de patogenicidade proveniente de microrganismos patogênicos presentes. A ação da microbiota presente nos solos não estéreis e nas plantas produzidas na sua maioria por microrganismos presentes no solo. Foram realizados ensaios de isolamento, identificação e detecção enzimática em bactérias mesofílicas presentes no lodo de esgoto coletado na Estação Mangueira em diferentes temperaturas (28 e 37°C) e na presença e/ou ausência de NaCl. Foram detectados em ambas temperaturas testadas, bactérias patogênicas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp*). No screening enzimático realizado, na detecção da amilase os melhores resultados foram obtidos nas amostras de bactérias mesofílicas isoladas a 28 °C e na detecção de urease os melhores resultados foram obtidos nas amostras a 37 °C.

Palavras-Chave: Lodo de Esgoto, Bactérias Mesofílicas, Enzimas Hidrolíticas

ABSTRACT

The sewage sludge is a resultant residue of the system of residuary biological water treatment proceeding, presents in its chemical composition one high concentration of organic components and inorganic, that after treatments, can be used in agriculture, however its application to the ground modifies many times the physical parameters, chemical and biological of the ground. The ground is a complex system that a variety of microhabitats with different physical and chemical gradients understands and discontinues ambient conditions. The metal presence weighed in the sewer sludge, limits its use in the processes of fertilization of the ground, had to the high degree of toxicity through the absorption for the plants, that will feed the herbivorous, the metals can enter in the alimentary chain, arriving at the consumers first-class and the man, and the high index of pathogenicity proceeding from pathogenic microorganisms gifts. The action of microbiota present in not barren ground and the plants, is one of the main factors of removal of pathogenic microorganisms that arrive with the sewer at the ground, contaminating this environment many times of irreversible form. The process of mineralization of the organic substance is catalyzed by different enzymes, produced in its majority for microorganisms gifts in the ground. Assays of isolation, identification and enzymatic detention in mesophilic bacteria had been carried through gifts in the silt of sewer collected in the Station Hose in different temperatures (28 and 37°C) and in the presence and/or absence of NaCl. They had been detected in both tested temperatures, pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp). In screening enzymatic carried through, in the resulted detention of amylase the best ones had been gotten in the samples of the 28 °C isolated mesophilic bacteria and in the resulted detention of urease the best ones had been gotten in the 37 °C samples.

Key Words: Sewage Sludge, Mesophilic Bacteria, Microbial Hydrolitic Enzyme

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, diversos problemas têm sido levantados sobre a qualidade do solo como um dos motivos de preocupação mundial. O conceito atual de qualidade do solo inclui diversos aspectos, tais como: solo, planta e produtividade biológica, qualidade ambiental e sanidade animal e humana e a grande quantidade de geração de resíduos que são depositados no mesmo (FEAM, 2002; PUNA; BAPTISTA, 2008).

Um dos principais problemas que qualquer cidade enfrenta é o da coleta e tratamento de resíduos por ela gerados. Quanto maior o número de pessoas que vive em uma determinada cidade, maior será a sua geração de resíduos. Cada resíduo possui características específicas, que levam à necessidade de diferentes formas de coleta, tratamento e disposição. Na maioria dos casos, o volume de resíduos gerados supera, em muito, a capacidade natural de assimilação do meio que circunda esses centros urbanos (FERNANDES, 2001; MOURA, 2002; BRASIL, 2005; VELLOSO, 2008).

O lodo de esgoto (LE) é uma denominação genérica para o resíduo sólido gerado pelos sistemas de tratamento de águas residuárias. É um material heterogêneo, cuja composição depende do tipo de tratamento empregado para diminuição do esgoto e das características das fontes geradoras (população e indústrias) (CAMPOS; ALVES, 2008; KITAMURA et al., 2008; LEITE et al., 2009)

No Brasil, a aplicação de lodo de esgoto nos solos ainda não foi amplamente difundida em algumas regiões, porém vários estudos realizados comprovaram a eficácia do uso agrícola desse resíduo (JORGE et al., 1991; BARBOSA et al., 2002; TRANNIN et al., 2005; DE MARIA et al., 2007). Entretanto, a possível presença de poluentes, como os metais pesados, patógenos e compostos orgânicos persistentes, são fatores que podem provocar impactos ambientais negativos. As principais preocupações em relação à adição de metais pesados ao solo são: entrada destes na cadeia alimentar, redução da produtividade agrícola devido a efeitos fitotóxicos, acúmulo no solo, alteração da atividade microbiana e contaminação de recursos hídricos. Os processos que conduzem à solubilização dos metais ao solo são mais importantes em relação à disponibilidade e à mobilidade desses elementos (SASTRE et al., 1996; VIG et al., 2003; LAMBAIS e DO CARMO, 2008).

Bactérias e fungos são organismos mais ativos nos processos de decomposição de compostos orgânicos do solo, afetando diretamente a disponibilidade de nutrientes para as plantas e as propriedades químicas e físicas no solo. As enzimas possuem participação essencial nos processos relacionados à qualidade do solo, pois é através delas que os

microrganismos do solo degradam moléculas orgânicas complexas em moléculas simples que podem ser assimilados pelos microrganismos. Além de permitir que os microrganismos tenham acesso à energia e nutrientes presentes em substratos complexos, as enzimas extracelulares são responsáveis pela decomposição e mineralização de nutrientes no solo, disponibilizando-os também para as plantas e promovendo assim a ciclagem de nutrientes no solo (SASTRE et al., 1996; SANOMIYA e NAHAS, 2003; CENCIANI et al., 2008; SHENTU et al., 2008).

As avaliações de atividades enzimáticas do solo, podem ser úteis para indicar em que medida este está desempenhando seu potencial de ciclagem de nutrientes, nitrificação, oxidação e outros processos vitais relacionados à saúde do mesmo (BURGESS e PLETSCHKE, 2008).

Portanto, o comportamento da população microbiana depende da qualidade e da quantidade dos resíduos que estão sendo adicionados ao solo. Dessa forma, é indispensável estudos sobre o uso agrícola do lodo de esgoto, o conhecimento sobre as alterações nas comunidades e nas atividades microbianas do solo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a presença de bactérias mesofílicas no lodo de esgoto e seu potencial biotecnológico através da atividade de enzimas hidrolíticas.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar as bactérias mesofílicas presentes no lodo de esgoto, no solo agricultável e no solo com adição de lodo em temperaturas de 28 e 37 °C;
- Verificar a influência da presença de cloreto de sódio (NaCl) no isolamento das bactérias mesofílicas;
- Analisar o perfil biotecnológico dos isolados bacterianos do lodo de esgoto através da detecção da atividade enzimática de urease e amilase em isolados com e sem a presença de NaCl.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Lodo de Esgoto

Os lodos de esgotos (LE) são resíduos orgânicos gerados durante o processo de tratamento biológico de águas residuárias. Apesar de sua composição química variável, os LE são ricos em matéria orgânica e nutrientes para as plantas e microrganismos. Dependendo da origem das águas residuárias, os LE podem conter quantidades elevadas de metais (Zn, Cu, Cd), além de microrganismos patogênicos (BAATH, et al., 1998; DAVIS et al., 2004; CAMPOS e ALVES, 2008). Quando existe o tratamento de esgoto com a separação de parte sólida, surge o biossólido que pode ser utilizado como adubo no solo, provenientes das residências, estabelecimentos comerciais, agroindustriais e industriais. Neste aspecto, o lodo de esgoto desempenha uma função extremamente importante na dinâmica dos solos, influenciando em suas características químicas, físico-químicas, biológicas e físicas (BARBOSA et al., 2004).

Como visto, o esgoto que é o resíduo proveniente das descargas doméstica, industriais e rurais, contém em média 99,9 % de água e 0,1 % de sólidos. A porção sólida contém 70 % de material orgânico (proteínas, carboidratos, gorduras, etc.) e 30 % de materiais inorgânicos, que é constituído principalmente de areia e metais. No Brasil, a aplicação de lodo de esgoto nos solos ainda está em fase de difusão, porém vários estudos comprovam a eficiência do uso agrícola desse resíduo, entretanto a possível presença de poluentes, como metais pesados, é um fator que pode provocar impactos ambientais considerados negativos (OLIVEIRA 1995; SILVA et al., 2002; PIRES e MATIAZZO 2007; SOARES et al., 2008).

A reciclagem agrícola dos lodos de esgoto ou biossólidos, destaca-se tanto na forma de reduzir a pressão sobre a exploração dos recursos naturais, como evitar opções de destino final que envolvem custos mais elevados e com maior impactação no meio ambiente e na população, como a incineração e a disposição em aterros sanitários (ANDREOLI et al., 1999; TRANNINI et al., 2005).

A aplicação de LE no solo pode contribuir para um aumento na concentração de nutrientes essenciais, como o N e o P, e para o melhoramento dos atributos físicos do solo altamente intemperizados. No entanto, dependendo da origem do LE, a concentração de metais pesados pode contribuir para a contaminação do solo e acarretar um possível efeito deletério em plantas e na população microbiana existente (FLIEBBACH et al., 1994, LEITA et al., 1995, VIG, et al., 2003, LAMBAIS e CARMO, 2008).

O objetivo dos sistemas de tratamento de esgoto (Figura 1), quando produzem o lodo, é concentrar as impurezas e o material potencialmente poluidor dos esgotos nesse subproduto. Assim, pela própria forma como é originado, o lodo é o concentrador dos nutrientes, da matéria orgânica, dos metais pesados, dos organismos patogênicos e de outros elementos que podem oferecer risco ao meio ambiente e a saúde humana, caso não sejam controlados e monitorados adequadamente (DUMONTET et al., 1999; DE MARIA et al., 2007).

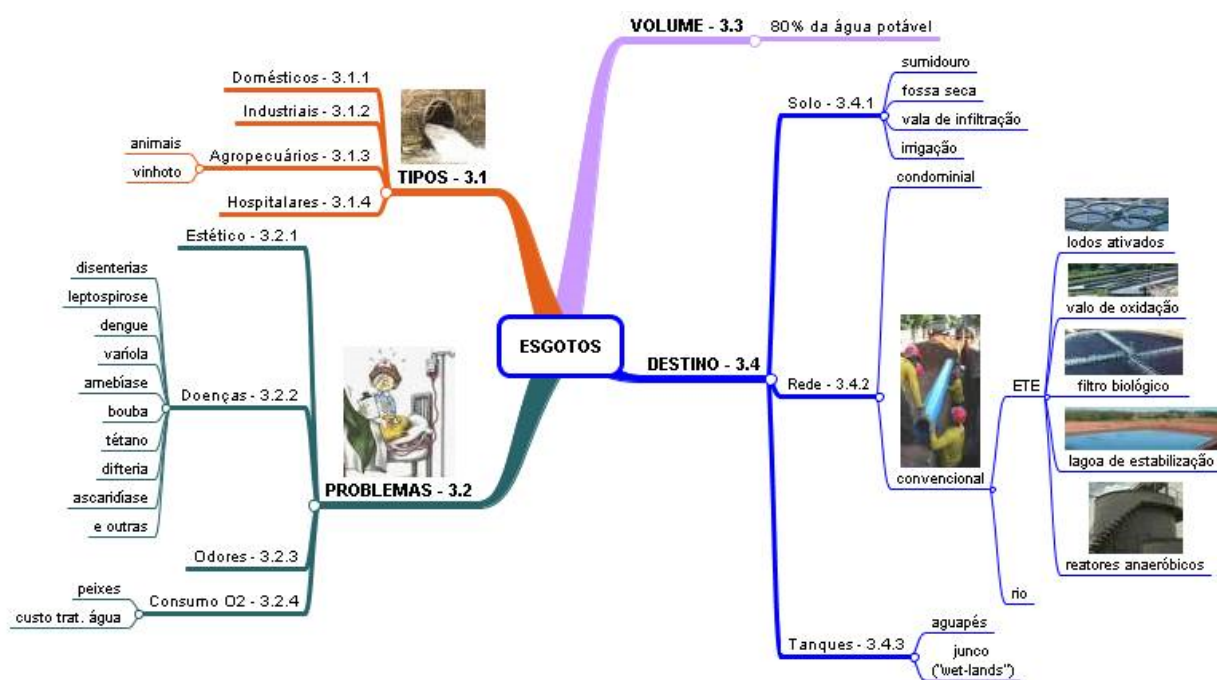


Figura 1 – Esquema de tratamento de esgotos domésticos (Fonte: São Paulo, 2000)

O problema da disposição final dos resíduos urbanos, especificadamente o caso do lodo de esgoto, tem grande perspectiva de agravamento, pois o país necessita, a curto prazo, de resgatar a dívida ambiental do setor de saneamento que lança diariamente 10 bilhões de litro de esgoto bruto nos rios brasileiros, que se reflete na degradação dos recursos ambientais com graves conseqüências no perfil sanitário da população. O lodo gerado pela ampliação do tratamento somente nos esgotos que hoje são coletados no Brasil, ampliaria potencialmente a atual produção em aproximadamente 8,5 milhões de metros cúbicos de lodo, por ano (BETTIOL et al., 1983; CHRISTENSEN et al., 2002)

No processo de biodecomposição de matéria orgânica a presença de água favorece a condução de enzimas e de outros metabólitos microbianos contribuindo, dessa

forma, para o importante processo de otimização da relação custo/benefício de tratamento de resíduos sólidos orgânicos. Nos lodo de esgoto o teor de umidade é função da biodecomposição da fração orgânica putrescível, das condições climáticas e do tipo de coleta (TAUK, 1990; TCHOBANOGLIOUS et al., 1993; CAMPOS e ALVES, 2008).

O lodo de esgoto, quando aplicado ao solo, pode causar diversas alterações na estrutura e no funcionamento do agroecossistema, sendo a comunidade microbiana um dos componentes mais sensíveis, podendo ser utilizada como indicador da qualidade dos solos. A aplicação de lodo de esgoto pode tanto estimular, devido ao aumento de carbono e nutrientes disponíveis, como inibir, devido à presença de metais pesados e outros poluentes, a atividade microbiana do solo (ROCHA e SHIROTA, 1999; CAMPOS e ALVES, 2008).

Alterações nas atividades microbianas dos solos podem ser determinadas por meio de análises, como biomassa microbiana, respiração, quociente metabólico e atividades enzimáticas do solo (DICK, 1994; GILLER et al., 1998; ANDERSON & DOMSCH, 1990; BAATH, 1989; BROOKES, 1995), ou da comunidade microbiana pela contagem dos organismos. Isto é possível, pois as alterações no solo proporcionadas pela adição de lodo poderão ocorrer de três formas: a) produzindo ação tóxica direta sobre os microrganismos; b) por meio de distúrbios funcionais, desnaturação de proteínas e destruição da integridade de membranas celulares, alterando as condições físicas e químicas do ambiente; e c) diminuindo a disponibilidade de substratos energéticos essenciais ao desenvolvimento dos microrganismos (BROOKES & McGRATH, 1984; BROOKES, 1995).

Entretanto, juntamente com o material orgânico e com os nutrientes disponíveis às plantas, o emprego de determinados lodos pode ser limitados pela presença de metais pesados como Cu, Ni, Fe, Zn, Mn, Co, Hg, Cd, Pb e Cr (Figura 2), os quais em quantidades consideráveis, podem levar à contaminação do solo e das plantas (GILLER et al., 1998; MELO et al., 2001). Os metais pesados podem influenciar no crescimento, morfologia e no metabolismo dos microrganismos do solo, reduzindo a atividade microbiana e a fertilidade do solo (Figura 2) (KELLY e TATE, 1998; SANDAA e ENGER, 2001; OBBARD, 2001; MORENO et al., 2001).

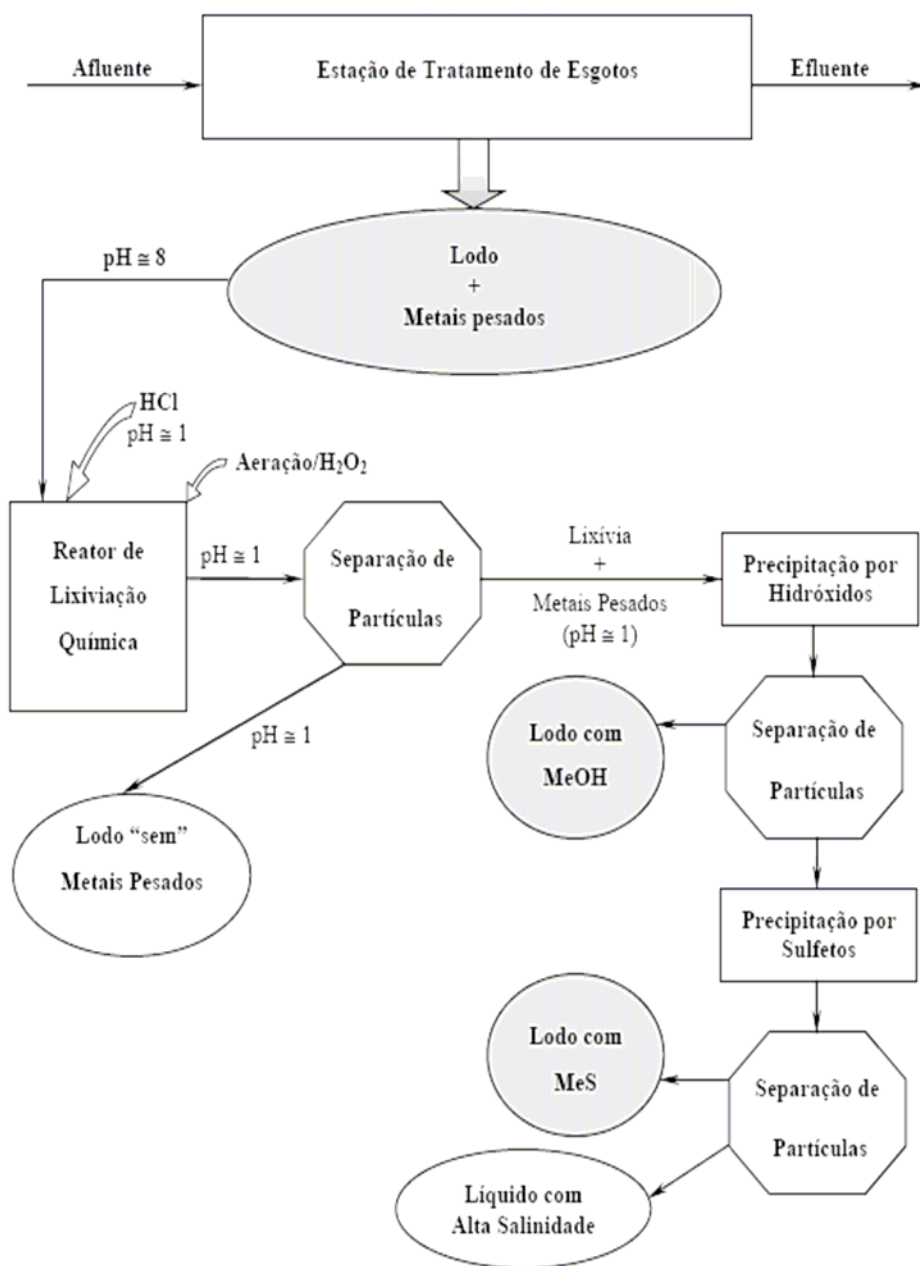


Figura 2 - Esquema conceitual de um processo físico-químico para remover metais pesados de lodo de esgoto. (Fonte: ARAÚJO e MONTEIRO, 2007).

1.3.2 Solo

O solo é considerado a parte mais importante da geosfera, sendo um sistema aberto natural e heterogêneo, que se desenvolve em escalas de tempo da ordem de centenas a milhares de anos, e compõe a cobertura pedológica que reveste as áreas **emersas** da Terra. Essa cobertura é constituída por uma camada de material alterado que se localiza entre a atmosfera e a litosfera, e é fortemente influenciada pela biosfera e pela hidrosfera através de trocas de energia e matéria constantes (COLEMAN et al., 1983; LAUBER et al, 2008; SOPENA et al. 2008; ZIESCHE e MECHTHILD, 2008).

O solo é um sistema trifásico, com uma fase sólida relativamente estável e com uma porosidade que pode ser ocupada com volumes variáveis de água, sempre complementares aos espaços ocupados pelo ar. A sua constituição básica é uma porção inorgânica, constituída por minerais inorgânicos e partículas de areia, silte e argila, e outra fração orgânica, composta de formas estáveis da matéria orgânica derivadas da decomposição pela biota do solo, a própria biota, composta de minhocas, insetos, bactérias, fungos, algas, nematóides e gases como O₂, CO₂, N₂, NO_x (PIETRAMELLARA et al., 2002).

Os solos são constituídos de uma porção inorgânica e outra orgânica. A porção orgânica é chamada de matéria orgânica (MO), sendo constituída de compostos orgânicos com características químicas bem definidas como polissacarídeos, proteínas, ligninas, açúcares, aminoácidos entre outros. A matéria orgânica pode ser avaliada pelo teor de carbono orgânico total e é considerada como um indicador chave da qualidade do solo (SARKAR et al., 1986; NACHTERGAELE et al., 2000)

A porção orgânica é chamada de matéria orgânica que é constituída de compostos que apresentam características químicas bem definidas, como polissacarídeos, proteínas, ligninas, açúcares, aminoácidos, etc, e também constituídos por compostos sem suas características bem definidas, que são as substâncias húmicas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina) (STEINBERG et al., 2008; RITCHIE e PERDUE, 2008; RUSPIASH e VIDYASAGAR, 2008).

A qualidade do solo pode ser definida através das modificações naturais presentes nas suas características em função das atividades humanas e do manejo. Algumas práticas de manejo, como a utilização de restos de cultura como cobertura morta, presentes no sistema de plantio direto, aumenta o teor de matéria orgânica ocasionando um efeito positivo na qualidade dinâmica do solo (CONRAD et al., 2007; WEBSTER et al., 2008).

1.3.2.1 Matéria Orgânica do Solo (MOS)

A matéria orgânica do solo (MOS) é um dos principais indicadores de qualidade do solo, em razão da atuação nas propriedades físicas, químicas e biológicas, sendo considerada de grande importância para a sustentabilidade da fertilidade e da produtividade em diversos solos (NAMBIAR, 1996; SEGNINI et al., 2008).

Nos estudos realizados sobre MOS, tem-se dado mais atenção às camadas de solo consideradas superficiais (0-20 cm), onde os principais componentes vivos são as raízes de plantas, a fauna e o consórcio de microrganismos habitantes do solo. As camadas mais profundas correspondem entre a 60 e 80 % do total existente, sendo encontradas diferentes substâncias orgânicas, desde materiais livres e com elevada biodisponibilidade, até compostos mais estabilizados quimicamente, associados diretamente à fase mineral (CHRISTENSEN, 1992; FREIXO et al., 2002; FERNANDES et al, 2005).

A camada denominada de manta orgânica que contém raízes, microrganismos, frações leves, formas solúveis em água e substâncias não húmicas constituem os compartimentos mais lábeis da MOS (TIRROL-PADRE and LADHA, 2004). As formas lábeis de C têm grande importância em vários processos no solo, podendo ser ressaltados a formação e estabilização de agregados (BLAIR e CROCKER, 2000; DUFRANC et al., 2004; PASSOS, et al., 2007), fonte de nutrientes e energia para organismos, e aumento da mobilidade de alguns nutrientes como Mg e Ca. Portanto há necessidade de manutenção dos estoques de C no solo e da sustentabilidade de sistemas de produção.

O húmus é um dos produtos finais resultantes da atividade de degradação dos macro e microrganismos de restos de animais e vegetais presentes no solo. A fertilidade dos solos é geralmente relacionada com as características moleculares da fração alcalino solúvel do carbono orgânico, as substâncias húmicas (SH). Essa fração é ao mesmo tempo dinâmica, refletindo mudanças no uso do solo, e também é uma das frações responsáveis pela acumulação da matéria orgânica no solo (ARTIOLA-FORTUNY e FULLER, 1982; LÓPEZ et al., 2008; LAIRD et al., 2008).

A fração macrorrgânica presente na MOS é constituída de resíduos de plantas em decomposição, de substâncias humificadas e não-humificadas. As substâncias não-humificadas incluem carboidratos, lipídeos, aminoácidos, proteínas, ligninas, ácidos nucléicos, pigmentos e uma variedade de ácidos orgânicos. Por sua vez, as substâncias consideradas

humificadas, que constituem de 70 a 80 % da MO são representadas pelas frações dos ácidos fúlvicos, e húmicos e pela humina, determinadas com base na solubilidade em ácido ou álcali.

A MOS que consiste de restos vegetais ou animais, não decompostos ou parcialmente decompostos (restos de plantas, raízes, microrganismos) e seus produtos de decomposição, atuam na regulação de diferentes processos do solo (ciclagem, disponibilidade de nutrientes, solubilização de fertilizantes, complexação de elementos tóxicos). (STEVENSON, 1994; STEINBERG et al., 2008; RITCHIE e PERDUE, 2008; RUSPIASH e VIDYASAGAR, 2008).

A matéria húmica é uma mistura complexa originada através de alterações de substâncias não húmicas pela degradação microbiana e condensação aleatória dos produtos da degradação dos organismos vivos. São ricas em carbono (45-65 %) e oxigênio (30-40 %) que podem, em parte estar ligados à grupos funcionais como CCOCH_3 , OH e COOH, contendo nitrogênio (2-6 %), e pequenas quantidades de fósforo, enxofre orgânico e cinzas. A sua composição depende da origem e da natureza da amostra, como também dos processos de extração e purificação (ANDREOLI; LARA; FERNANDES, 1999).

As substâncias húmicas (SH), representam o maior reservatório terrestre de carbono orgânico na Terra, e possuem o importante papel na fertilidade e estabilização de agregados do solo. Embora possuam um alto grau de resistência a biodegradação no solo, elas degradam, e o estado estacionário da síntese, é atingido através de um decaimento característico, o qual depende do tipo de solo e da forma como é manejado (ANDREOLI; LARA; FERNANDES, 1999).

Os ácidos húmicos são solúveis em bases, mas precipitam em pH menor que 2. A humina é insolúvel em soluções aquosas a qualquer valor de pH. A fração humina, que contém os compostos mais estáveis, pode permanecer por milhares de anos no solo e é considerada a mais adequada para datação da matéria orgânica do solo (HAYES e MALCOLM, 2001; WUILLLOUD et al., 2003; ADANI e SPAGNO, 2008).

1.3.2.2 Metais Pesados

Metais pesados são elementos químicos que possuem peso específico maior que 5 g/cm^3 ou número atômico maior que 20. Entretanto, esse termo “metais pesados” é utilizado para elementos químicos que contaminam o meio ambiente, provocando diferentes danos à

biota, podendo ser metais, semi-metais, ou mesmo ametais como o selênio (LINWAY, 1979; ANTOSIEWICZ, 1992; ALLOWAY, 1995; KABATA e PENDIAS, 2001).

Os principais elementos químicos enquadrados neste grupo são: alumínio (Al), antimônio (Sb), arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cobalto (Co), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg), molibdênio (Mo), níquel (Ni), selênio (Se) e o zinco (Zn). Esses elementos são encontrados naturalmente no solo em concentrações inferiores às consideradas como tóxicas para diferentes organismos vivos. Entre os metais As, Co, Cr, Cu, Se e o Zn são essenciais para os organismos (BOWEN, 1979; BARCELÓ e POSCHENRIEDER, 1992; SILVA, 2006).

Os metais pesados se encontram distribuídos por toda a natureza. Nos solos, os metais são originários da rocha de origem e de outras fontes adicionadas ao solo, como a precipitação atmosférica, cinzas, calcário, fertilizantes químicos e adubos (esterco de animais, lixo domiciliar e lodo de esgoto). (ACCIOLY e SIQUEIRA 2000; RANGEL et al., 2006). Esses metais pesados contidos no lodo de esgoto são normalmente originários da atividade industrial, pois as Estações de Tratamento de Esgotos recebem os esgotos sanitários, que se compõem de esgotos domésticos, água de infiltração e de esgoto industrial RIBEIRO FILHO et al., 2001; BORGES e COUTINHO, 2004; COSTA et al., 2008).

A planta retira do solo os elementos minerais indispensáveis para seu desenvolvimento. Conforme a quantidade que é necessária para seu perfeito crescimento, eles são denominados de macronutrientes (N, P, K, S, Ca, Mg) ou micronutrientes (B, Cl, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Na, Se, Zn). Além desses elementos que são essenciais, a planta pode absorver outros elementos considerados não essenciais (Al, Ag, Cd, Cr, Hg, Pb) (LINDWAY, 1979; MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA et al, 1997; BORGES e COUTINHO, 2004).

Os metais pesados não apenas exercem efeitos considerados negativos sobre o crescimento das plantas, mas também afetam os diversos processos bioquímicos e microbiológicos que ocorrem no solo. A decomposição do material orgânico adicionado ao solo, a mineralização do nitrogênio e a nitrificação podem ser inibidos em locais contaminados por metais pesados (VIEIRA, 2001; BOEIRA et al, 2002).

Os metais pesados contidos no lodo de esgoto, podem ser divididos em duas categorias, dependendo do risco que eles representam às plantas e aos animais. São considerados metais que oferecem risco (manganês, ferro, alumínio, cromo, arsênio, selênio, antimônio, chumbo e mercúrio). Os metais potencialmente perigosos aos seres humanos e animais são o zinco, cobre, níquel, molibdênio e cádmio (RIBEIRO FILHO et al., 2001; FADIGAS et al., 2006; COSTA et al. 2008).

A contaminação do solo com metais pesados pode também resultar na diminuição da diversidade genética e alteração da estrutura das diversas comunidades microbianas existentes (TORSVIK et al., 1998; SANDDA et al., 1999; GANS et al., 2005). Em solos contaminados com As e Cd, alterações na estrutura da comunidade das bactérias, avaliadas por meio da separação de fragmentos do gene rRNA 16S por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), e inibição de atividades de fosfatase alcalina, arilsulfatase, protease e urease em relação ao controle não contaminado, foram observadas (LORENZ et al., 2006). A diminuição da atividade enzimática nos solos tratados com metais pode ser atribuída à redução da eficiência do metabolismo microbiano devido as altas condições de estresse que os microrganismos passam no ambiente, repercutindo assim na diminuição de suas atividades enzimáticas normais (VIEIRA, 2001).

1.3.2.3 Microrganismos do Solo

Os microrganismos são responsáveis pelos diversos processos de mineralização, liberando uma quantidade considerável de nutrientes potencialmente disponíveis para as plantas (CARDOSO et al., 1992). Esses organismos fazem parte do solo de uma maneira dissociável, sendo responsáveis por inúmeras reações bioquímicas relacionadas, não só com a matéria orgânica, mas também com o intemperismo das rochas. Assim, os microrganismos do solo desempenham um papel fundamental na gênese do solo e ainda atuam como reguladores de nutrientes, pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos elementos, atuando, portanto, como fonte e dreno de nutrientes para o crescimento das plantas (SNEH et al, 2008).

Esses organismos são também chamados coletivamente de microbiota, e são representados por cinco grandes grupos: bactérias, fungos, algas e protozoários. Apesar de constituírem somente 1 a 4 % do carbono total e ocuparem menos de 5 % do espaço poroso do solo, a diversidade e a quantidade de microrganismos é bastante elevada. Entretanto, como o solo é normalmente um ambiente estressante, limitado por nutrientes, somente 15 % a 30 % das bactérias e 10 % dos fungos encontram-se degradando a matéria orgânica do solo. Os componentes microbianos vivos do solo são também denominados de biomassa microbiana e as bactérias e os fungos respondem por cerca de 90 % da atividade microbiana do solo (LYNCH, 1986; ARAÚJO e MONTEIRO, 2007).

Dentre os componentes da matéria orgânica do solo, os microrganismos são os mais afetados pelo constante uso e manejo do solo, pois exercem uma ação importante nos

processos de agregação dos solos. Algumas práticas de cultivo aumentam a oxidação da matéria orgânica através da quebra dos agregados do solo, expondo assim novas superfícies aos inúmeros ataques microbianos, através da formação de consórcios, pois a elevada estabilidade das substâncias húmicas é atribuída à sua estrutura química complexa e às suas interações com minerais de argila e com cátions metálicos, que se expressam na formação de diversos compostos agregados (NEVES et al., 2009; WHITESIDE et al., 2009).

Em geral se considera que a microbiota do solo, formada principalmente por bactérias e fungos, desempenham um importante papel na fertilidade, reciclagem de nutrientes, evolução, estrutura e manutenção do mesmo.

1.3.3 Enzimas Microbianas

As enzimas são produtos microbianos mais explorados da indústria biotecnológica após a produção de antibióticos. As enzimas microbianas representam uma série de vantagens sobre as de origem animal e vegetal; entre elas o custo de produção que é relativamente baixo. Os microrganismos fornecem uma grande variedade de enzimas obtidas em laboratórios por processos fermentativos em condições controladas e reproduzíveis (BORNSCHEUER, 2002; SAID e PIETRO, 2002).

A perspectiva de desenvolvimento da biotecnologia no século 21, em diferentes setores industriais, tem sido considerada como bastante heterogênea. Até o momento, diversas indústrias tem demonstrado um forte potencial de desenvolvimento significativo, tendo se destacado a indústria farmacêutica, seguida da indústria de produção de enzimas microbianas (NEVES et al., 2009; WHITESIDE et al., 2009).

As enzimas são responsáveis pelo controle de diversas funções vitais, incluindo os processos metabólicos que convertem nutrientes em energia e em novos materiais para as células, além de acelerarem a reação de diversos processos bioquímicos, tornando-os mais eficientes. Possuem uma grande especificidade, auxiliando na composição e/ou decomposição de determinadas substâncias em condições especiais de temperatura, de pH e de concentração do substrato. As enzimas são constituídas de uma ou mais cadeias de L-aminoácidos ligadas covalentemente por meio de ligações peptídicas. A composição dos aminoácidos e a sua sequência na cadeia, são específicas a cada enzima. A atividade catalítica de diversas enzimas depende da ligação com componentes não protéicos,

denominados de co-fatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas complexas (SAID e PIETRO, 2002).

As enzimas são altamente específicas tanto na reação catalisada como na escolha do substrato. Cada enzima contém um sítio ativo, a parte da molécula na qual ocorre a combinação com o substrato, que consiste em diferentes partes da cadeia protéica (a enzima). A atividade enzimática ocorre em duas etapas, onde, na primeira o sítio ativo da enzima combina com o substrato para formar um complexo enzima-substrato. Esse complexo enzima-substrato em seguida rompe-se para formar os produtos e uma enzima livre, a qual reage novamente. De acordo com essa teoria o substrato deve ajustar-se ao sítio ativo da enzima; por isso a especificidade dessa enzima (SACKHEIM e LEHMAN, 2001).

1.3.4 Enzimas Relacionadas com o Solo

As enzimas são mediadoras do catabolismo biológico dos componentes orgânico e mineral do solo. A atividade enzimática do solo está relacionada diretamente com a matéria orgânica, com as propriedades físicas e com a atividade e biomassa microbiana (SEYBOLD et al., 1998; BALOTA, et al., 2004).

Além disso, a atividade enzimática pode ser utilizada como medida de atividade microbiana, produtividade e efeito de poluentes no solo. Taylor et al. (2002) sugerem duas razões para avaliar a presença das enzimas do solo. A primeira, como informativo do potencial bioquímico e de manipulação do solo, e a segunda, como indicador de qualidade devido a sensibilidade para prover informações sobre mudanças nas funções-chave do solo.

As enzimas têm participação essencial nos processos relacionados à qualidade do solo, pois é através delas que os microrganismos do solo degradam as moléculas orgânicas complexas em moléculas mais simples, que podem ser facilmente assimiladas. Além de permitir que os microrganismos tenham acesso à energia e nutrientes presentes em substratos complexos, as enzimas extracelulares são responsáveis pela decomposição e mineralização de nutrientes no solo, disponibilizando-os também para as plantas e promovendo assim a ciclagem de nutrientes no solo (ZAK et al., 1994; BURNS e DICK, 2002).

As principais enzimas utilizadas para avaliação da qualidade do solo estão descritas na Tabela 1, pois as enzimas estão presentes no solo tanto associadas às células microbianas (enzimas intracelulares), quanto não associadas (enzimas extracelulares). Existem correlações entre a atividade enzimática e os outros indicadores biológicos do solo.

As enzimas exercem funções bioquímicas em todos os processos de decomposição da matéria orgânica nos sistemas do solo. Elas são importantes na catálise de várias reações necessárias para o processo de vida dos microrganismos em solos e na estabilização de estruturas do solo, na decomposição de resíduos orgânicos, formação de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (MAKOI e NDAKIDEMI, 2008).

No solo, as enzimas desempenham um papel importante nos processos de mineralização da matéria orgânica. São provenientes de animais, vegetais e fontes microbianas e da conseqüente atividade biológica, incluindo os processos metabólicos de todos esses organismos. As informações da atividade enzimática do solo usadas para determinar as características microbiológicas são importantes para a qualidade do solo (AŞKIN e KIZILKAYA, 2005). As enzimas livres normalmente têm vida curta porque podem ser rapidamente desnaturadas, degradadas ou irreversivelmente inibidas. As enzimas extracelulares são normalmente associadas com os colóides do solo, como argilas e substâncias húmicas e atuam como um núcleo estável da atividade do solo.

Tabela 1- Principais enzimas indicadoras da qualidade do solo

Enzimas do solo	Reação enzimática	Atividade indicadora
Desidrogenase	Sistema de transporte de elétrons	Atividade microbiana
Beta-glucosidase	Hidrólise de celobiose	Clivagem do carbono
Celulase	Hidrólise de celulose	Clivagem de carbono
Urease	Hidrólise da uréia	Clivagem de nitrogênio
Amidase	Mineralização do nitrogênio	Clivagem do nitrogênio
Fosfatase	Liberação de PO_4^-	Clivagem de fósforo
Arisulfatase	Liberação de SO_4^-	Clivagem de enxofre

Fonte: (SAID e PIETRO, 2004).

Balota et al. (2004) investigaram a atividade de algumas enzimas do solo (amilase, celulase, arisulfatase e fosfatase) em sistemas de manejo convencional, plantio direto e rotação de culturas e observaram significantes correlações entre a atividade enzimática e o C e N microbiano do solo. Anteriormente, Zak et al., (1994), Burns e Dick (2002), observaram uma relação significativa entre as enzimas, tais como fosfatase, amidase e catalase, e a respiração e biomassa microbiana do solo.

Como as enzimas estão presentes em baixas concentrações no solo, a quantificação destas é feita de maneira indireta, através da medida da sua atividade, e não pela sua quantidade. Geralmente a atividade é medida através da quebra de um substrato específico para cada enzima em condições padronizadas de pH e temperatura (DECKER et al., 1999; CARREIRO et al., 2000).

As atividades enzimáticas também têm sido utilizadas como indicadores de qualidade em solos contaminados com metais pesados. Estudos demonstram que algumas enzimas são sensíveis ao aumento da concentração de alguns elementos químicos no solo. Foi observado que a atividade das enzimas urease, fosfatase ácida, arilsulfatase e desidrogenase diminuíram à medida que aumentaram as concentrações de zinco, cobre, níquel e cádmio no solo, enquanto que a atividade da β -glucosidase não sofreu praticamente nenhuma alteração, mesmo com altas concentrações desses elementos no solo (KHAN e SCULLION, 2000; KHAN e SCULLION, 2002).

A escolha das enzimas a serem analisadas para avaliar a qualidade do solo baseia-se na sua sensibilidade ao manejo do solo, na decomposição da matéria orgânica e na operacionalidade da análise. As enzimas mais comumente analisadas são as hidrolases ligadas aos ciclos dos principais elementos do solo como C, N, P e S (TRASAR-CEPEDA, et al., 2008).

Dentre os fatores externos que influenciam na atividade enzimática do solo, a temperatura é um parâmetro físico muito importante. Com o aumento da temperatura aumenta-se a velocidade das reações de hidrólises até atingir a temperatura ótima. A temperatura influencia quase todas as reações celulares e, em geral, as reações procedem mais rapidamente em temperaturas mais altas, mas todas as enzimas têm temperatura ótima e uma tolerância abaixo e acima dependendo da utilização do substrato (BURGESS e PLETSCHE, 2008).

A International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) classificou as enzimas em seis grandes grupos (Tabela 2), de acordo com o tipo de reação que catalisam.

Tabela 2 – Nomenclatura das enzimas com suas respectivas características

ENZIMA	CARACTERÍSTICAS
Oxido-redutases	Catalisam reações de oxidação-redução. O substrato oxidado é um hidrogênio ou doador de elétrons.
Transferases	Catalisam a transferência de grupos entre duas moléculas. O doador pode ser um cofator (coenzima) que carrega o grupo a ser transferido.
Hidrolases	Catalisam a reação de hidrólise de várias ligações covalentes.
Liasas	Catalisam a clivagem de ligações C-C, C-O, C-N através de hidrólise ou oxidação. Tem dois substratos envolvidos em uma direção e apenas um na direção contrária da reação.
Isomerases	Catalisam a modificação de uma única molécula sem participação de outra.
Ligases	Catalisam reações de síntese de uma nova molécula a partir da ligação entre duas moléculas com a hidrólise de ATP ou outro composto trifosfatado.

Fonte : (SACKHEIM e LEHMAN, 2001).

1.3.5 Enzimas Hidrolíticas

1.3.5.1 Urease

A uréia é um dos mais importantes fertilizantes químicos nitrogenados e sua aplicação tem sido recomendada no setor agrícola. A urease do solo está envolvida na mineralização do nitrogênio e no fornecimento de nitrogênio às plantas a partir de fontes naturais e de fertilizantes. A taxa da hidrólise de uréia depende de vários fatores como tipo de solo, teor de matéria orgânica, teor de umidade do solo, temperatura e níveis de salinidade e alcalinidade. Alguns desses fatores aceleram e outros retardam a taxa de hidrólise de uréia no solo. Apesar de ser uma das principais fontes de nitrogênio para as culturas, a uréia tem mostrado baixa eficiência por conta do nitrogênio perdido na atmosfera através da volatilização, um processo mediado pela urease que causa poluição ambiental (MAKOI e NDAKIDEMI, 2008).

Quanto maior for a razão enzima/uréia, mais curto o tempo necessário para a completa decomposição da uréia. Uma determinada quantidade de enzima decompõe por

unidade de tempo a mesma quantidade de uréia. O tempo requerido para completa decomposição da amostra de uréia pode, portanto, ser reduzido na proporção exata que diminui a quantidade de uréia na amostra ou aumenta a quantidade de enzima (FLIEBBRACH; MARTENS e REBER, 1994).

No solo, a urease pode ser encontrada como uma enzima livre em solução, ligada a partículas coloidais e no interior de células microbianas. A atividade da urease aumenta quando ocorre uma elevação da taxa de matéria orgânica no solo e um aumento da biomassa microbiana, numa relação diretamente proporcional. A urease é a enzima que catalisa a hidrólise da uréia para dióxido de carbono e amônia, afetando a utilização desse importante fertilizante nitrogenado. Sua ocorrência é grande em plantas e microrganismos (particularmente as bactérias) e tem sido detectada na mucosa gástrica do homem e de alguns animais. Sua presença em solo foi primeiro indicado por ROTINI (1935), evidenciando que os solos continham urease e indicando ser tal enzima responsável pela conversão do nitrogênio da uréia em amônia. Trabalhos recentes foram também realizados por alguns autores (KLOSE & TABATABAI, 1999; BENINI ET AL., 1999; OLIVEIRA et al., 2007).

À exceção de um grupo pequeno de ureases ácidas, a urease microbiana possui um pH ótimo próximo a neutralidade e freqüentemente são desnaturadas de forma irreversível pela exposição a valores de pH abaixo de 5. (DOERR, SHAKESBY e WALSH 2000).

1.3.5.2 Amilase

As amilases são enzimas que pertencem à classe das hidrolases e são extensamente produzidas por microrganismos, plantas e animais, e são enzimas conversoras do amido (PANDEY et al., 2000; BURHAN et al., 2003; MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005). Embora elas possam ser derivadas de diversas fontes, as de origem microbiana são geralmente as mais procuradas pelas indústrias. As espécies do gênero *Bacillus* são consideradas as principais fontes de amilases (OLIVEIRA et al., 2007).

As amilases são responsáveis pelo processo de germinação e maturação de sementes e grãos que são fundamentais na digestão do amido nos animais, resultando assim na formação de diversos açúcares, que são usados subseqüentemente em várias atividades metabólicas, também, no solo (LELOUP et al., 1994).

As α -amilases podem ser obtidas por diversas espécies microbianas, principalmente por linhagens de *Aspergillus sp.* e *Bacillus sp.*, especialmente *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis* que são as mais utilizadas em processos de

fermentação submersa e em diversas aplicações industriais, (RAIMBAULT, 1980; KRUGER et al., 1987; BOSE e DAS, 1996; EGAS et al., 1998; VISWANATHAN e SURLIKAR, 2001; RUBINDER et al., 2002; RAMACHANDRAN et al., 2004; WANDERLEY et al., 2004; GOYAL et al., 2005; NAZMI et al., 2006; KONSOUOLA e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2007).

Durante décadas as α -amilases tiveram aplicações restritas a processos de panificação, sendo sempre utilizadas na forma não purificada. Nos últimos anos as α -amilases não têm sido usadas apenas em processos de fermentação, mas extensivamente estudada e, em consequência disto, encontra-se hoje, no mercado sob formas diversas de α -amilases, com diferentes características e aplicações na indústria de processamento de alimentos (ex. panificação), farmacêutica, têxteis e de papel (BEYNUM et al., 1985; KEARSLEY e DZIEDIC, 1995; ELLAIAH et al., 2002; GIGRAS et al., 2002; UMA MAHESWAR RAO, SATYANARAYANA, 2007). A maior aplicação para a α -amilase está na produção de hidrolisados de amidos. Atualmente são descritas na literatura quatro tipos de enzimas conversoras de amido: as endoamilases, as exoamilases, as enzimas desramificadoras e as transferases (VANDER MAAREL et al., 2002; SAID e PIETRO, 2004; SYED et al., 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J.O. **Contaminação química e bioremediação do solo**, Tópicos em Ciências do Solo, v. 1, p-299-351, 2000.

ADANI, F.; SPAGNO, M. Humic Acid Formation in Artificial Soils Amended with Compost at Different Stages of Organic Matter Evolution. **Journal Environmental Quality**, n. 37, p.1608-1616, 2008.

ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soil**, 2. ed., New York: Blackie Academic & Professional, 368p., 1995.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Application of ecophysiological quociente (qCO_2 and Dq) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p. 251-255, 1990.

ANDREOLI, C.V.; LARA, A.J.; FERNANDES, F. Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções. **Sanepar**, 288p., 1999.

ANTOSIEWICZ, D.M. Adaptation of plants to an environment polluted with heavy metals, **Acta Societatis Botanicorum Polinae**, v. 61, p.281-299, 1992.

ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R. Indicadores biológicos de qualidade do solo, **Bioscience Journal**, v. 23, n.3,p.66-75, 2007.

ARTIOLA-FORTUNY, J.; FULLER, W.H. Humic Substances in Landfill Leachates: I. Humic Acid Extraction and Identification, **Journal Environmental Quality**, v. 11, p. 663-669, 1982.

BAATH, E. Effects of heavy metals in soil on microbial process and population (a review). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 47, p. 335-379, 1989.

BAATH, E.; DIAZ-RAVINA, M.; FROSTEGARD, A.; CAMPBELL, C.D. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 238-245, 1998.

BALOTA, E.L.; KANASHIRO, M.; COLOZZI FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R P. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in sub-tropical agro-ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 300-306, 2004.

BARBOSA, G. M. C.; TAVARES FILHO, J.; FONSECA, I. C. B. Condutividade hidráulica saturada e não saturada de Latossolo Vermelho eutroférico tratado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência de Solo**, v. 28, n.2, p.403-407, 2004.

BARBOSA, G.M.C.; TAVARES FILHO, J.; FONSECA, I.C.B. Avaliações de propriedades físicas de um Latossolo Vermelho eutroférico tratado com lodo de esgoto por dois anos consecutivos. **Sanare**, v. 17, p. 94-101, 2002.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados, **Suelos y Planta**, v. 2, p. 345-361, 1992.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W.R.; WILSON, K.S.; MILLETI, S.; CIURLI, S. & MORGANI, S. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. **Structural. Folder. Design**, 7:205-216, 1999.

BETTIOL, W.; CARVALAHO, P.C.T.; FRANCO, B.J.D.C. Utilização do lodo de esgoto como fertilizante. **O Solo**, v. 75 (1), p. 44-54, 1983.

BEYNUM, G. M. A. van; ROELS, J. A. Starch Conversion Technology. **Food Science and Technology**. vol. 14. Marcel Dekker Inc. New York, NY, p. 362. 1985.

BLAIR, N.; CROCKER, G.J. Crop rotation effects on soil carbon and physical fertility of two Australian soils, **Australian Journal Soil Research**, v. 38, p. 71-84, 2000.

BOEIRA, R.C.; LIGO, M.A.V.; DYNIA, J.F. Mineralização de nitrogênio em solo tropical tratado com lodos de esgoto, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1639-1647, 2002.

BORGES, M.R.; COUTINHO, E.L.M. Metais pesados do solo após aplicação de bio-sólido: II Disponibilidade, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 557-568, 2004.

BORNSCHEUER, U.T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases, **Current Opinion Biotechnology**, v. 13(6), p. 543-547, 2002.

BOSE, K.; DAS, D. Thermostable α -amylase production using *Bacillus licheniformis* NRRL B 14368. **Ind. J. Exp. Biol.**; v. 34 (12), p. 1279-82, 1996.

BOWEN, H.J.M. Environmental chemistry of the elements, London, Academic Press, 340p., 1979.

BRASIL. Resolução nº 357, 17-3-2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de águas e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília: **CONAMA**, 23 p., 2005.

BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, v.19, p. 269-279, 1995.

BROOKES, P.C.; MCGRATH, S.P. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. **Journal of Soil Science**, v. 35, p. 341-346, 1984.

BURGESS, J.O.; PLETSCHE, B.I. Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A mini-review. **Water SA**, v. 34, n.3, p. 343-350, 2008.

BURHAN, A.; NISA, U.; GOKHAN, C.; OMER, C.; ASHABIL, A.; Osman. G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6. **Process Biochemistry**. v. 38 (10), p.1397–1403, 2003.

BURNS, R.G.; DICK, R.P. **Enzymes in the environment**: activity, ecology and applications. Marcel Dekker, New York, p. 340, 2002.

CAMPOS, F.S. ; ALVES, M.C. Uso de lodo de esgoto na reestruturação de solo degradado, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p.1389-1397, 2008.

CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360p., 1992.

CARREIRO, M.M.; SINSABAUGH, R.L.; REPERT, D.A.; PANKHURST, D.F. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. **Ecology**, v. 81, p.2359-2365, 2000.

CENCIANI, K.; FREITAS, S.S.; CRITTER, S.A.M. e AIROLDI, C. Microbial enzymatic activity and thermal effect in a tropical soil treated with organic materials. **Science Agricola**, v. 65, n.6, p. 674-680, 2008.

CHRISTENSEN, B.T. Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates, **Advances in Soil Science**, v. 20, p. 1-90, 1992.

CHRISTENSEN, K.K. ; CARLSB,K, M.; KRON, E. Strategies for evaluating the sanitary quality of composting. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 1143–1158, 2002.

COLEMAN, D. C.; REID, C. P. P.; COLE, C. V. Biological strategies of nutrient cycling in soil systems. **Advances in Ecological Research**, v.13, p.1-55. 1983.

CONRAD, R.; KLOSE, M.; NOLL M; KEMNITZ, D.; BODELIER, P. L. E. Soil type links microbial colonization of rice roots to methane emission, **Global Change Biology**, v. 14, n.3, p.657 – 669, 2007.

COSTA, M. C. R.; DAMILIANO, C. R.; VASCONCELLOS, A.; COSTA, R. C. Diagnóstico ambiental de área industrial contaminada por metais pesados, **Revista de Biociências**, v.14, n.1, p.51-61, 2008.

DAVIS, M. R. H.; ZHAO, F. J.; MCGRATH, S. P. Pollution- induced community tolerance of soil microbes in response to a zinc gradient, **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.23, p.2665-2672, 2004.

DE MARIA, I. C.; KOCSSIS, M. A.; DECHEN, S. C. F. Agregação do solo em área que recebeu lodo de esgoto. **Bragantia**, v.66, p.291-298, 2007.

DE MARIA, L.C.; CASTRO, O.M.; SOUZA DIAS, H. Atributos físicos do solo e crescimento radicular de soja em Latossolo Roxo sob diferentes métodos de preparo do solo, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.703-709, 1999.

DECKER, K. L. M.; BOERNER, R. E. J.; MORRIS, S. J. Scale-dependent patterns of soil enzyme activity in a forested landscape. **Can. J. For. Res.**, v.29, p.232-241, 1999.

DICK, R.P. Soil enzyme assays as indicators of soil quality. In: DORAN, J.W.L.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Ed.). **Defining soil quality for a**

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (Org.). **Methods for assessing soil quality**. Madison: SSSA, p. 25-37, 1996.

DUFRANC, G.; DECHEN, S.C.F.; FREITAS, S.S.; CAMARGO, O.A. Atributos físicos, químicos e biológicos relacionados com a estabilidade de agregados de dois Latossolos em plantio direto no Estado de São Paulo, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.505-517, 2004.

DUMONTET, S.; DINEL, H.; BALODA, S.B. Pathogen reduction in sewage sludge by composting and other biological treatments: a review. **Biological Agriculture and Horticulture** v.16, p.409–430, 1999.

EGAS, M. C.; Da COSTA, M. S.; COWAN, D. A.; PIRES, E. M. Extracellular alpha-amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: Purification and biochemical characterization. **Extremophiles**, v.2, n.1, p.23–32, 1998.

ELLAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a new isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**, v.38, p.4, p.615–620, 2002.

FADIGAS, F.S.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B., MAZUR, N.; ANJOS, L.H.C.; FREIXO, A.A. Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n.3, p.699-705, 2006.

FEAM. Fundação Estadual do Meio Ambiente. **Como destinar os resíduos sólidos urbanos**. Belo Horizonte, 2002. 260p.

FERNANDES, J. U. J.. **Lixo: limpeza pública urbana**. Gestão de resíduos sólidos sob o enfoque do direito administrativo. 1 ed; Belo Horizonte: Del Rey, 2001. 190p.

FERNANDES, S.A.P; BETTIOL, W.; CERRI, C.C.; CAMRAGO, P. Sewage sludge effects on gas fluxes at the soil-atmosphere interface, on soil $\delta^{13}\text{C}$ and on total soil carbon and nitrogen, **Geoderma**, v. 125, p.49-57, 2005.

FREIXO, A.A.; MACHADO, P.L.O de A.; SANTOS, H.P. dos; SILVA, C.A; FADIGAS, F. de S. Soil organic carbon and fractions of a Rhodic Ferralsol under the influence of tillage and crop rotation systems in Southern Brazil, **Soil and Tillage Research**, v.64, p.221-230, 2002.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil, **Science**, v.309, p.1387-1390, 2005.

GIGRAS, P.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Statistical media optimization and production of ITS α -amylase from *Aspergillus oryzae* in a bioreactor. **Current Microbiology**, v.45, n.3, p.203–208, 2002.

GILLER, K.E.; WITTER, E.; McGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1389-1414, 1998.

GILLER, K.E.; WITTER, E.; MCGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review. **Soil Biology Biochemistry**, v.30, p.1389-1414, 1998.

GOYAL, N.; GUPTA, J. K.; SONI, S. K. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, n.7, p.723–734, 2005.

HAYES, M. H. B.; MALCOLM, R.L. Considerations of compositions and aspects of structures of Humic substances. In C.E. Clapp et al (ed). Humic substances and chemical contaminants, **Soil Sciences Society of America**, v.65, p.3-39, 2001.

JORGE, J. A.; CAMARGO, O. A.; VALADARES, J. M. A. S. Condições físicas de um Latossolo Vermelho-Escuro quatro anos após a aplicação de lodo de esgoto e calcário. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.15, p.237-240, 1991.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soil and plants**, 3 ed., CRC Press, Boca Raton, 413 p., 2001.

KEARSLEY, M. W.; DZIEDIC, S. Z. Handbook of Starch hydrolysis products and their derivatives. **Chapman & Hall**, p.275, 1995.

KELLY, J. J.; TATE, R. L. Effects of heavy metals contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of zinc smelter. **Journal of Environmental Quality**, v.27, p.600-617, 1998.

KHAN, M.; SCULLION, J. Effect of soil on microbial responses to metal contamination, **Environmental Pollution**, v.110, p.115-125, 2000.

KHAN, M.; SCULLION, J. Effects of metal (Cd,Cu,Ni,Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities, **Applied Soil Ecology**, v.20, p.145-155, 2002.

KITAMURA, A. E.; ALVES, M. C.; SUZUKI, L. G. A. S.; GONZALEZ, A. P. Recuperação de um solo degradado com a aplicação de adubos verdes e lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.405-416, 2008.

KLOSE, S. & TABATABAI, M.A. Urease activity of microbial biomass in soils. **Soil Biological. Biochemistry.**, 31:205-211, 1999.

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Co-production of α -amylase and b-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. **Bioresource Technology**. v.98, p.150–157, 2007.

KRUGER, J. E.; LINEBACK, D. R. In: J. E. Kruger, D. Enzymes and their role in the cereal technology. **Lineback, and C. E. Stautter** (Eds.), St Paul, Minnesota: AACC. p.117–139, 1987.

LAIRD, D. A.; CHAPPELL, M. A.; MARTENS, D. A.; WERSHAW, R. L.; THOMPSON, M. Distinguishing black carbon from biogenic humic substances in soil clay fractions, **Geoderma**, v.143, n.1-2, p.115-122, 2008.

LAMBAIS, M. R.; DO CARMO, J. B. Impactos da aplicação de biossólidos na microbiota de solos tropicais, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1129-1138, 2008.

LAUBER, C. L.; STRICKLAND, M. S.; BRADFORD, M. A.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types, **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, n.9, p.2407-2415, 2008.

LEITA, L.; DENOBILI, M.; MUHLBACHOVA, G.; MONDINI, C.; MARCHIOL, L.; ZERBI, G. Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation, **Biology and Fertility of Soils**, v.19, p.103-108, 1995.

LEITE, V.D.; LOPES, W. S.; DE SOUSA, J.T.; PRASAD, S.; SILVA, S.A. Tratamento anaeróbio de resíduos sólidos orgânicos com alta e baixa concentração de sólidos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.2, p.190–196, 2009.

LELOUP, V.; COLONA, P.; BULÉON, A. In: B. Godon (Ed.), **Bioconversion of cereal products**. New York: VCH., p.79–127, 1994.

LINDWAY, W.L. **Chemical equilibria in soils**, Wiley Interscience, New York, 341p., 1979.

LIU, H.; TIAN, Y.; ZHENG, T.; YAN, C.; HONG, H. Studies of glucosidase activities from surface sediments in mangrove swamp, **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.367, n.2, p.111-117, 2008.

LÓPEZ, R.; GONDAR, D.; IGLESIAS, A.; FIOL, S.; ANTELO, J.; ARCE, F. Acid properties of fulvic and humic acids isolated from two acid forest soils under different vegetation cover and soil depth, **European Journal of Soil Science**, 67-76, 2008.

LORENZ, N.; HINTEMANN, T.; KRAMAREWA, T.; KATAYAMA, A.; YASUTA, T.; MARSCHNER, P.; KANDELER, E. Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure, **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1430-1437, 2006.

LYNCH, J.W. **Biotecnologia do solo**. São Paulo: Manole, 209 p., 1986.

MAKOI, J. H. J. R.; NDAKIDEMI, P. A. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, n.3, v.7, p.181-191, 2008.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**, 2 ed., Piracicaba, 319p., 1997.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**, 2 ed., Academic Press, New York, 889p, 1995.

MELO, W.J. D.E.; MARQUES, O.M.; MELO, V.P. O uso agrícola de biossólido e as propriedades do solo. In: TSUTIXA, M.T.; COMPARINI, J.B.; ALEM SOBRINHO, P.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P.C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O (Eds). **Biossólido na Agricultura**. São Paulo: SABESP, Cap. 11, p.289-363, 2001.

MELO, W.J.; MARQUES, O.M. Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. (Eds). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguarúna, SP: EMBRAPA- Meio Ambiente, p.142-193, 2000.

MORENO, J. L.; GARCIA, C.; LANDI, L.; FALCHINI, L.; PIETRAMELLARA, G.; NANNIPIERI, P. The ecological dose value (ED50) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. **Soil Biology Biochemistry**, v.33, p.483-489, 2001.

MOURA, L. A. A. de. **Qualidade e gestão ambiental**. 3 ed. São Paulo: Juarez de Oliveira, 2002. 250p.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases—an overview. **Carbohydrate Polymers**. v.60, p.163–173, 2005.

NACHTERGAELE, F. O.; SPAARGAREN, O.; DECKERS, J. A.; AHRENS, B. New developments in soil classification World Reference Base for Soil Resources, **Geoderma**, v.96, n.4, p.345-357, 2000.

NAMBIAR, E.K.S. Sustained productivity of forest is a continuing challenge to soil science, **Soil Science Society American Journal**, v.60, p.1629-1642, 1996.

NAZMI, A. R.; Reinisch, T.; Hinz, H. J. Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α -amylase (BLA). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.453, p.16–23, 2006.

NETO, P. F.; PACHECO, E.; FERRARI, V. M.; FORTES, N. L. P. Quantificação de microrganismos amonificadores e nitrificadores no solo tratado com lodo de esgoto, **Revista de Biociências**, v.13, n.1-2, p.55-62, 2007.

NEVES, C. M. N.; NAVES SILVA, M. L.; NILTON CURI, N.; MACEDO, R. L. G.; MOREIRA, F. M. S.; D'ANDRÉA, A. F. Indicadores biológicos da qualidade do solo em sistema agrossilvopastoril no noroeste do estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.1, p.105-112, 2009.

OBBARD, J.P. Ecotoxicological assessment of heavy metals in sewage sludge amendend soils. **Applied Geochemistry**, v.16, p.1405-1411, 2001.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.27, n.1, p.61-66, 2007.

OLIVEIRA, F. C.; MARQUES, M. O.; BELLINGIERI, P. A.; PERECIN, D. Lodo de esgoto como fonte de macronutrientes para cultura de sorgo granífero, **Sciencia Agrícola**, v.52, p.360-367, 1995.

OLIVEIRA, F.C. **Comportamento de metais pesados e formas nitrogenadas em solos tratados com lodo de esgoto**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Dissertação de mestrado, 91 p., 1995.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHEL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. **Process Biochem.**, v.35, p.1153–1169, 2000.

PASSOS, R. R.; RUIZ, H. A.; MENDONÇA, E. S; CANTARUTTI, R. B.; SOUZA, A. P. Substâncias húmicas, atividade microbiana e carbono orgânico lábil em agregados de um Latossolo vermelho distrófico sob duas coberturas vegetais, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1119-1129, 2007.

PIETRAMELLARA, G.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; RENELLA, G. Soil as a biological system, **Annals of Microbiology**, v.52, p.119-131, 2002.

PIRES, A. M. M.; MATTIAZZO, M. E. Cinética de solubilização de metais pesados por ácidos orgânicos em solos tratados com lodo de esgoto, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.143-151, 2007.

PUNA, J.F.B. e BAPTISTA, B.S. A gestão integrada de resíduos sólidos urbanos - perspectiva ambiental e económicoenergética. **Química Nova**, v.31, n.3, p.645-654, 2008.

RAIMBAULT, M. Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. **O.R.S.T.O.M.** p.291.1980.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; CHANDRAN, S., SZAKACS, G., SOCCOL, C. R., PANDEY, A. Alpha Amylase from a Fungal Culture Grown on Oil Cakes and Its Properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.47, n.2, p.309-317, 2004.

RANGEL, O. J. P.; SILVA, C. A.; BETTIOL, W.; DYNIA, J. F. Efeitos de aplicações de lodo de esgoto sobre os teores de metais pesados em folhas e grãos de milho, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.583-594, 2006.

RIBEIRO FILHO, M.R. et al. Fracionamento e biodisponibilidade de metais pesados em solos contaminados incubado com materiais orgânicos e inorgânicos, **Revista de Ciência do Solo**, v.25, p.495-507, 2001.

RITCHIE, J.D.; PERDUE, E.M - Analytical constraints on acidic functional groups in humic substances, **Organic Geochemistry**, v.39, n.6, p.783-799, 2008.

ROCHA, M. T.; SHIROTA, R. Disposição final do lodo de esgoto. **Revista de Estudos Ambientais**, v.1, n.3, p.1-25, 1999.

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

RUBINDER, K.; CHADHA, B. S.; SINGH, N.; SAINI, H. S.; SINGH, S. Amylase hyperproduction by *T. lanuginosus* mutants. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v.29, p.70 – 74, 2002.

RUPIASIH, N. N.; VIDYASAGAR, P. B. Humic Substances: Structure, Function, Effects and Applications, **Asian Journal of Water, Environment and Pollution**, v.5, n.2, p.39-47, 2008.

SACKHEIM, G. I.; LEHMAN, D. D. **Química e Bioquímica para Ciências Biomédicas**. São Paulo: Manole., 234 p., 2001.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: **Legis Summa**, 412 p, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico**, Eventos, 122 p., 2002.

SANDAA, R.A.; ENGER, O. and TORSVIK, V. Abundance and diversity of Archeae in heavy-metal-contaminated soils, **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.3293-3297, 1999.

SANDAA, R.A.; ENGER, O. Influence of long-term heavy metal contamination on microbial communities in soil. **Soil Biology Biochemistry**, v.33, p.287-295, 2001.

SANOMIYA, L.T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural Santa Maria**, v.33, n.5, p.835-842, 2003.

SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. CETESB. **Sistema de aplicação de bio sólidos e lodos de tratamentos biológicos em áreas de uso agrícola: critérios para projeto e operação.** São Paulo, 29p., 2000.

SARKAR, P. K.; BIDWELL, O. W.; MARCUS, L. F. Selection of Characteristics for Numerical Classification of Soils, **Soil Science Society American Journal**, v.30, p.269-272, 1986.

SASTRE, I.; VICENTE, M.A.; LOBO, M.C. Influence of the applications of sewage sludge on soil microbial activity. **Bioresource Technology**, v.57, p.19-23, 1996.

SEGNINI, A.; SANTOS, L. M.; LOPES DA SILVA, W. T.; MARTIN-NETO, L.; BORATO, C. E; MELO, W.J.; BOLONHEZI, D. Estudo comparativo de métodos para determinação da concentração de carbono em solos com altos teores de Fé (latossolos), **Química Nova**, v.31, n.1, p.94-97, 2008.

SEYBOLD, C. A.; HERRICK, J. E.; BREDJA, J. J. Soil resilience: a fundamental component of soil quality, **Soil Science**, v.164, p.224-233, 1998.

SHENTU, J. L.; HE, Z. L.; YANG, X. E.; LI, T. Q. Microbial activity and community diversity in a variable charge soil as affected by cadmium exposure levels and time. **Journal of Zhejiang Science B**, v.9, n.3, p.250-260, 2008.

SILVA, J. E.; RESCK, D. V. S.; SHARMA, R. D. Alternativa agrônômica para o bio sólido produzido no Distrito Federal. I-Efeito na produção de milho e na adição de metais pesados no Latossolo no cerrado, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.487-495, 2002.

SILVA, M. L. S. **Avaliação do comportamento de elementos: traços essenciais e não essenciais em solo contaminado sob o cultivo de plantas**, Tese (doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, 112p., 2006.

SNEH, G.; MEENU, W.; GERA R., KAPOOR K.K., KUNDU B.S. Impact of sewage sludge application on soil microbial biomass, microbial processes and plant growth – A review. **Agricultural Reviews**, v.29, n.1, p.245-267, 2008.

SOARES, E. M. B.; SILVA, C. A.; DIAS, B. O.; BETTIOL, W.; BELIZÁRIO, M. H. Frações da matéria orgânica de Latossolo sob influência de doses de lodo de esgoto, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, p.1231-1240, 2008.

SOPEÑA, F.; MAQUEDA, C.; MORILLO, E. Influence of Soil Characteristics and Formulation on Alachlor Dissipation in Soil, **Soil Science Society American Journal**, v.72, p. 767-774, 2008.

STEINBERG, C. E. W.; MEINELT, T.; TIMOFEYEV, M. A; BITTNER, M.; MENZEL, R. Humic substances Part 2: Interactions with organisms, **Environmental Science and Pollution Research**, v.15, n.2, p.128-135, 2008.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry**: genesis, composition, reactions, 2.ed., New York, John Wiley & Sons, 496p., 1994.

sustainable environment. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124. (Soil Science Society of America Special Publication, 35).

SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View, **Environmental Science Technology**, v.39, n.23, p.9009 -9015, 2005.

SYED, D.G.; AGASAR, D.; PANDEY, A. Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, n.2, p.189-194, 2009.

TAUK, S. M. Biodegradação de Resíduos Orgânicos no Solo. **Revista Brasileira de Geociência**, v.20, n.1-4, p.299-301. 1990.

TCHOBANOGLIOUS, G. T.; THEISEN, H.; VIGIL, S. A. **Solid waste**: engineering principle and management issues. New York: McGraw-Hill Book Company, 621p., 1993.

TIROL-PADRE, A.; LADHA, J.K. Assessing the reliability of permanganate-oxidizable carbon as an index of soil labile carbon, **Soil Science Society American Journal**, v.68, p.969-978, 2004.

TORSVIK, V.; D.A.A.E, F.L.; SANDAA, R.A.; OVREAS, L. Novel technique for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments, **Journal of Biotechnology**, v.64, p.53-62, 1998.

TRANNIN, I. C. B.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Avaliação agronômica de um bio-sólido industrial para a cultura do milho, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.3, p.261-269, 2005.

TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M.C.; GIL-SOTRES, F. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, n.9, p.2146-2155, 2008.

UMA MAHESWAR RAO, J. L.; SATYANARAYANA, T. Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology**. v.98, p.345–352, 2007.

VAN DER MAAREL et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, p. 137–155, 2002.

VAN ZOMEREN, A.; VAN DER WEIJ-ZUIVER, E.; COMANS, R. N. J. Development of an automated system for isolation and purification of humic substances, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.391, p.2365-2370, 2008.

VELLOSO, M. P. Os restos na história: percepções sobre resíduos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.13, n.6, 1953-1964, 2008.

VIEIRA, R.F. Sewage sludge effects on soybean growth and nitrogen fixation, **Biology and Fertility of Soils**, v.34, p.196-200, 2001.

VIG, K., MEGHARAJ, M., SETHUNATHAN, N. and NAIDU, R. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: A review, **Advances Environmental Residue**, v.8, p.121-135, 2003.

VISWANATHAN, P.; SURLIKAR, N. R. Production of α -amylase with *Aspergillus flavus* on Amaranthus grains by solid-state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v.41, n.1, 57–64, 2001.

WANDERLEY, K. J.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiology Letters**. V.231, p.165–169, 2004.

WEBSTER, E. A; TILSTON, E.L; CHUDEK, J. A.; HOPKINS, D. W. Decomposition in soil and chemical characteristics of pollen, **European Journal of Soil Science**, v.59, n.3, 551 – 558, 2008.

WHITESIDE, M. D.; TRESEDER, K. K.; ATSATT, P. R. The brighter side of soils: Quantum dots track organic nitrogen through fungi and plants. **Ecology**, v.90, n.1, 100-108, 2009.

WUILLOUD, J. C. A.; WUILLOUD, R. G.; SADI, B. B. M.; CARUSO, J. A. Trace humic and fulvic acid determination in natural water by cloud point extraction/preconcentration using non-ionic and cationic surfactants with FI-UV detection, **Analyst**, v.128, p.453-458, 2003.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MOORHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1101-1108, 1994.

ZIESCHE, T. M.; MECHTHILD, R. Influence of environmental parameters on small-scale distribution of soil-dwelling spiders in forests: What makes the difference, tree species or microhabitat?, **Forest Ecology and Management**, v.255, n.3-4, p.738-752, 2008.

CAPÍTULO II

DETECÇÃO DE AMILASE E UREASE EM BACTÉRIAS MESOFÍLICAS ISOLADAS DE LODO DE ESGOTO

**Manuscrito a ser submetido para publicação na Revista Brazilian Archives of
Biology and Technology.**

DETECÇÃO DE AMILASE E UREASE EM BACTÉRIAS MESOFÍLICAS ISOLADAS DE LODO DE ESGOTO

Albuquerque, U.S.¹; Sales, A. E.²; Messias, A.S.^{3,4} e Alves da Silva, C. A.^{3,4}

1- Mestrando em Desenvolvimento de Processos Ambientais; 2- Bolsista do PIBIC UNICAP; 3-Professor dos Cursos de Engenharias Ambiental e Química; 4 - Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais(NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil. calves@unicap.br

ABSTRACT

The sewage sludge is a residue generated during the process of biological residuary water treatment, being rich in organic substance and essential nutrients for the plants and the microorganisms. The contamination of the ground with contained heavy metals in the sewage sludge can result in the reduction of the genetic diversity and provoke alterations of the structure of the microbial communities. The bacteria are abundant in microbiota present in the ground, and are responsible for diverse existing enzymatic transformations, that assist the processes of decomposition and mineralization of diverse nutrients. This work had as objective the isolation, identification and hydrolytic enzyme detection (amylase and urease) of the mesophilic bacteria gifts in the sewage sludge, the ground and the ground treated with silt. The sewer silt was collected in the Station of Treatment of Mangueira, Recife-PE and the ground collected in the Experimental Station of Itapirema-IPA, Goiana city. The isolation was carried through through the use of the Technique of the Serial Dilution and the identifications made through the comment of the macroscopic and microscopic characteristics of the isolated ones, growth in specific ways of culture and the colorations of Gram and spores. The hydrolytic enzymes had been detected by the described methodology for HANKIN ANAGNOSTAKIS (1979). The gotten results had demonstrated that the temperature of 28°C, were the one that got a bigger total amount of isolated 259 (being 129 samples in ways with Nail and 130 samples without NaCl), when compared the temperature of 37°C that it presented in total 195 isolated (being 92 samples in ways with NaCl and 103 samples without NaCl). In both the temperatures had been found microorganisms pathogenic (*Escherichia coli*, *Shigella sp*, *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp*, *Enterobacter sp*) possibly proceeding from the treatment of the sewer silt. In the enzymatic assays, the best ones resulted had been gotten to the 28 °C, where an amylase production was gotten in all the isolated ones tested, having the *Streptococcus sp* (CPU 0120) gotten a halo of 70 mm. The detection of urease was observed in both the tested temperatures.

Keywords: Sewage Sludge, Amylase, Urease, Hydrolytic Enzyme

2.1 INTRODUÇÃO

O lodo de esgoto é um resíduo rico em matéria orgânica, proveniente do tratamento de águas residuárias, cuja composição depende do tratamento empregado para purificar o esgoto e as características das suas fontes geradoras (população e

indústrias). Dependendo da origem das águas residuárias, esse lodo pode conter quantidades elevadas de metais e/ou xenobiontes, além de microrganismos considerados patogênicos para animais e seres humanos (CAMPOS & ALVES, 2008; KITAMURA *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 2009)

A aplicação desses resíduos no solos pode contribuir para um aumento da concentração de nutrientes, como N e P, e para o melhoramento dos atributos físicos de solos altamente intemperizados. No entanto, dependo da origem do lodo de esgoto, o aumento da concentração de metais pesados pode contribuir para a contaminação do solo e acarretar possível efeito deletérico em plantas e microrganismos (LEITA *et al.*, 1995; VIG *et al.*, 2003; LAMBAIS & DO CARMO, 2008).

O funcionamento do ecossistema solo é largamente influenciado pela dinâmica da microbiota, pois a mesma possui um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica. A diversidade microbiana encontrada no lodo de esgoto é extremamente elevada, principalmente com relação à quantidade de bactérias mesofílicas patogênicas ou não (SIDHU & TOZE, 2009).

As enzimas microbianas têm participação essencial nos processos relacionados à qualidade do solo, pois é através delas que os microrganismos do solo degradam moléculas orgânicas complexas em moléculas simples que podem ser assimiladas. Além de permitir que os microrganismos tenham acesso à energia e nutrientes presentes em substratos complexos, as enzimas extracelulares são responsáveis pela decomposição e mineralização de nutrientes no solo, disponibilizando-os também para as plantas e promovendo a ciclagem de nutrientes no solo (MAKOL & NDAKIDEMI, 2008; CENCIANI *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2008).

A realização de análises referentes a atividade enzimática do solo, assim como de outras análises biológicas e bioquímicas, têm detectado alterações nos solos pelo seu uso, manejo ou outras influências antrópicas, com maior antecedência do que os indicadores químicos e biológicos. Como as enzimas estão presentes em baixas concentrações no solo, a quantificação é feita de maneira indireta, através da medida da sua atividade, e não pela sua quantidade (MATSUOKA *et al.*, 2008; CHAER & TÓTOLA, 2007).

As ureases participam do ciclo do N, contribuindo para liberação de N inorgânico. A urease catalisa a hidrólise da uréia a CO₂ e NH₃, e é amplamente distribuída na natureza e é detectada em microrganismos, plantas e animais (KLOSE & TABATABAI, 2000; IMAMURA *et al.*, 2006). As amilases são enzimas que pertencem à classe de hidrolases, sendo extensamente produzidas por microrganismos, plantas e animais, e são enzimas conversoras do amido (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005; PRAKASH GOUD *et al.*, 2009). Embora elas possam ser derivadas de diversas fontes, as de origem microbiana são geralmente as mais procuradas pelas indústrias. As espécies do gênero *Bacillus* são consideradas as principais fontes de amilases (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Atualmente são descritas na literatura quatro tipos de enzimas conversoras de amido: as endoamilases, as exoamilases, as enzimas desramificadoras e as transferases (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho foi o isolamento e a identificação das bactérias mesofílicas presentes no lodo de esgoto e avaliação da atividade enzimática desses isolados, através da detecção de amilase e urease, e verificando o efeito da presença ou ausência de NaCl e da temperatura na atividade enzimática.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Lodo de Esgoto, Solo Agricultável e Solo com Adição de Lodo

O lodo de esgoto foi coletado na Estação de Tratamento de Esgoto da Mangueira, localizada no bairro da Mangueira, Região Metropolitana do Recife-PE, oriundo do tratamento de esgoto tipicamente doméstico. O sistema de tratamento é formado por Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e manta de lodo (UASB) e lagoa de polimento, com desidratação natural do lodo de excesso do UASB em leitos de secagem, com produção de aproximadamente 10 t/mês (massa seca com 60 % de umidade) de lodo de esgoto. O solo foi coletado na Estação Experimental de Itapirema-IPA, município de Goiana-PE, que, após coleta foi seco ao ar e peneirado (5 mm). O solo recebeu doses de lodo de esgoto nas proporções de 0, 25, 50 e 75 ton/ha.

Isolamento das Bactérias Mesofílicas – Foi utilizada a técnica das diluições múltiplas, onde foram pesadas 1 grama de cada tratamento (0, 25, 50 e 75 t/ha) e diluídas em tubos contendo água estéril nas seguintes diluições: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Foram retirados 1 mL das três últimas diluições e colocadas em placas de Petri contendo o meio Ágar Nutritivo (AN) contendo ou não NaCl na concentração de 5 %. As placas foram incubadas a 28 e 37 °C, durante 5 dias, com acompanhamento diário. Foram verificadas as características macroscópicas das colônias isoladas nas temperaturas testadas, bem como a influência da presença do NaCl nas colônias isoladas.

Seleção e identificação das Colônias de Bactérias – Após o período de incubação em diferentes temperaturas, as colônias foram selecionadas de acordo com a forma e a coloração apresentada nas placas de Petri contendo ou não a presença de cloreto de sódio (NaCl), sendo repicadas para tubos contendo o mesmo meio do isolamento, sendo mantidas a 4 °C. As colônias foram identificadas segundo a metodologia descrita por KONOPHA *et al.* (2000) no meio Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI – *triple sugar iron*). Foram realizadas colorações de Gram e de esporos para confirmação dos gêneros bacterianos isolados.

Determinação de Metais Pesados – Os metais pesados foram determinados por absorção atômica com chama de ar-acetileno.

Detecção da Atividade Enzimática

Detecção da Amilase - Para a detecção da atividade amilolítica foi utilizada a metodologia descrita por HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1979), usando meio Ágar Nutritivo acrescido de 0,2 % de amido, que foi posteriormente distribuído em placas de Petri. Após solidificação do meio, foi realizado um furo no centro da placa, onde foi inoculada uma suspensão bacteriana previamente preparada de 100 µL. As placas foram incubadas à 28 °C e 35 °C, durante 96 horas, com acompanhamento diário. A

produção da enzima foi evidenciada após lavagem das placas com uma solução de lugol, através da formação de um halo opaco em volta da colônia. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Detecção da Urease - Para a detecção da atividade ureásica foi empregado o método de HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1979), utilizando Ágar Nutriente (camada inferior), com adição de 5 % de uréia. A camada superior foi feita com Ágar Tampão Fosfato, acrescido de 5 % de solução de uréia e 5% de solução de Azul de Bromotimol. Após solidificação do meio de cultura, foi realizado um furo no centro da placa de Petri com diâmetro 0,8cm, onde foram inoculados 100µL da suspensão bacteriana previamente preparada. As placas foram incubadas à 28°C e 37°C, durante 96 horas, com acompanhamento diário. Após o período de crescimento microbiano, a presença de um halo amarelo claro em torno da colônia indicou a presença da urease. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microrganismos estão diretamente envolvidos nos ciclos dos nutrientes do solo e, aliada à quantificação de bactérias e fungos totais, a avaliação de determinados grupos microbianos dá a indicação de como os processos bioquímicos estão ocorrendo (SILVEIRA *et al.*, 2004) . As avaliações das densidades populacionais na comunidade microbiana nos solos são importantes, tanto na identificação de fatores que exercem influência no equilíbrio microbiológico dos solos, como na caracterização das relações entre os diferentes grupos e espécies de microrganismos. Frequentemente estas avaliações são realizadas com base em diluições seriadas da suspensão do material sólido disponível, com contagens das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas de Petri (RANJARD & RICHAUME, 2001; LIU *et al.*, 2006).

Foram isoladas as bactérias mesofílicas presentes no lodo de esgoto, no solo agricultável e no solo com adição de lodo (0, 25, 50 e 75 t/ha) em diferentes temperaturas (28 e 37 °C) e em meios contendo ou não NaCl (Tabelas 1 e 2). Nas

amostras lodo de esgoto na temperatura de 28 °C foram isoladas 259 bactérias, sendo 129 colônias no meio contendo NaCl e 130 sem NaCl. Verifica-se que a maior quantidade de bactérias foram isoladas na amostra de 75 t/ha sem a presença de NaCl (43). Na temperatura de 37 °C, foram isoladas 195 bactérias, sendo 92 no meio de cultura contendo NaCl e 103 colônias no meio com ausência salina. A maior quantidade de isolados mesofílicos também foi verificado na amostra tratada de 75 t/h sem a presença de NaCl (34).

Os resultados quantitativamente obtidos corroboram com os dados descritos na literatura (TORSVIK *et al.*, 1996; WARDLE, 2006), pois as avaliações das densidades populacionais na comunidade microbiana nos solos, são consideradas importantes na identificação de fatores que exercem influência no equilíbrio microbiológico dos solos, como na caracterização das relações entre as espécies de microrganismos. A adequação dos procedimentos na preservação e no período de armazenamento das amostras de solo, do momento da coleta até sua utilização laboratorial, também é de importância fundamental no processo de avaliação das comunidades microbianas. As modificações das condições físicas, químicas e biológicas destas amostras devem ser minimizadas, visto que a atividade dos microrganismos é um processo dinâmico ao longo do tempo, e depende diretamente das condições ambientais (TORSVIK *et al.*, 1996; WAGNER & LOY, 2002). A presença de excesso de sais inorgânicos e orgânicos no meio de cultura, favorece ao aparecimento de consórcios ou de microrganismos halofílicos, que tendem a suportar uma descarga maior de poluentes ambientais, como os metais pesados, pois a ocorrência desses problemas não dependem apenas da concentração, mas da espécie química presente, que varia em função de fatores como o pH e o potencial de óxido-redução (SMITH, 2009; AN, & KIM, 2009; GILLER *et al.*, 2009).

Após o isolamento em diferentes temperaturas e na presença e ausência de NaCl, as colônias bacterianas foram mantidas em meio AN, e receberam uma numeração prévia que identificava a temperatura de isolamento, o meio com presença ou ausência de sal e procedência da amostra. Em seguida foram selecionadas colônias bacterianas baseadas em características macroscópicas (cor, verso e reverso da colônia, produção de pigmentos, etc). As colônias foram transferidas para o meio TSI para a identificação das colônias, além da realização da Coloração de Gram. Na

Tabela 3 e 4, encontram-se os resultados da identificação bacteriana das amostras em diferentes temperaturas de 28 e 37 °C. Nas culturas isoladas a 28 °C constatou-se a presença de bactérias patogênicas dos gêneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Alcaligenes* em todas as amostras de lodo e de solo tratado. Nas culturas isoladas a 37 °C descritas na Tabela 4, verifica-se a presença das mesmas espécies bacterianas isoladas a 28 °C, porém havendo um predomínio quantitativo maior de amostras de *Escherichia coli* e de outras bactérias entéricas patogênicas, e três amostras de actinomicetos. Esses resultados revelam que as densidades de populações bacterianas específicas podem ser estimadas quantitativamente e qualitativamente, através de atributos que os microrganismos apresentam, e que possibilitam a sua diferenciação das demais comunidades bacterianas e microbianas presentes (DUDLEY *et al.*, 1980; SANTAMARIA & TORANZOS, 2003; CAVINATTO & PAGANINI, 2007; VAZ-MOREIRA *et al.*, 2008; JATINDER & TOZE, 2009). O lodo gerado no tratamento de esgoto geralmente apresenta uma alta taxa de matéria orgânica, fósforo, nitrogênio e micronutrientes (SINGH & AGRAWAL, 2008; JEZIERSKA-TYS & FRAC, 2008). Esse resíduo se for tratado com cal, tem características de corrigir a acidez do solo, pois, quando o lodo é submetido ao processo de estabilização alcalina, seu pH fica básico. O nitrogênio é o principal componente do lodo de esgoto, logo pode-se afirmar que o elemento é o referencial para limitação de suas taxas de aplicação (BETTIOL & CAMARGO, 2000; AGUSTINI & ONOFRE, 2007; COLODRO *et al.*, 2007).

A problemática de altos índices de metais pesados no lodo é o aspecto mais importante, tendo em vista, quando se visava o aproveitamento agrícola do lodo de esgoto, pois a contaminação de metais nos solos poderia causar problemas irreversíveis, hoje esse processo já está controlado. Os metais adicionados ao solo através do lodo de esgoto, podem mudar sua composição química, e também persistirem no solo de uma forma extraível e disponível à absorção pelas plantas, e aos consórcios de microrganismos nativos do solo por vários anos. Foram realizados ensaios para determinação de metais na amostra de lodo de esgoto proveniente da Estação Mangueira. Os resultados obtidos evidenciam uma baixa concentração de cádmio (2,2 mg/kg) e de níquel (10 mg/kg) e uma alta concentração de alumínio (14600 mg/kg), cálcio (1180 mg/kg), cobre (909,8 mg/kg) e zinco (600 mg/kg). Esses resultados

sugerem que aplicações de lodo de esgoto possivelmente operam como com agente seletivo, estreitando a diversidade da população microbiana, porém para as espécies que permanecem, o lodo de esgoto não tem efeito negativo ou mesmo pode aumentar o crescimento de alguns gêneros de microrganismos, principalmente bactérias e fungos filamentosos. Os estudos realizados mostram a diminuição da diversidade da população microbiana do solo após aplicações de lodo de esgoto, porém verificando igual ou maior biomassa total do solo (WYSZKOWSKA & WYSZKOWSKI, 2002; NWUCHE & UGOJI, 2008).

As enzimas têm uma participação essencial nos processos relacionados à qualidade do solo, pois é através delas que os microrganismos do solo degradam as moléculas orgânicas complexas em moléculas simples que podem ser assimiladas. As enzimas extracelulares são responsáveis pelos processos de decomposição e mineralização de nutrientes no solo, disponibilizando-os também para as plantas e promovendo a ciclagem de nutrientes do solo (GIANFREDA *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2007; ACOSTA-MARTÍNEZ *et al.*, 2007; MAKOL e NDAKIDEMI, 2008).

Foi realizado um estudo do potencial biotecnológico das bactérias mesofílicas isoladas e identificadas do lodo de esgoto da estação da Mangueira, através da determinação em meio sólido da presença de amilase e urease, em diferentes temperaturas de produção (28 e 37 °C).

Os resultados obtidos estão descritos nas Tabelas 6 e 7 respectivamente. Na Tabela 6 estão descritos os valores obtidos à 28 °C para a amilase, observa-se que todos os isolados testados apresentaram atividade aminolítica, porém o melhor resultado foi obtido com a amostra de *Streptococcus sp (UCP 0120)* que apresentou um halo de 70 mm. Na detecção de urease, das 10 amostras testadas, 5 amostras apresentaram a mudança de coloração característica da urease e 5 amostras não apresentaram. Na Tabela 7 estão os valores obtidos para os ensaios enzimáticos à 37 °C. Observa-se que todas as amostras testadas não apresentaram atividade aminolítica, e que das 7 amostras testadas, 5 amostras apresentaram a mudança de coloração característica da urease e apenas 2 amostras não apresentaram.

As avaliações de atividades enzimáticas do solo podem ser úteis para indicar em que a medida está desempenhando seu potencial de ciclagem de nutrientes,

nitrificação, oxidação e outros processos vitais desempenhados pelos microrganismos. As enzimas estão presentes em baixas concentrações no solo, por isso a sua quantificação é realizada de maneira indireta, através da medida da sua atividade, e não pela sua quantidade. Geralmente, a atividade é medida através da quebra de um substrato específico para cada enzima a ser avaliada, em condições padronizadas de pH e temperatura (GIANFREDA *et al.*, 2002; KIZILKAYA & BAYRAKH, 2005; CALDWELL 2005; SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006; MAKOL & NDAKIDEMI, 2008; BURGESS & PLETSCHKE, 2008).

Na Tabela 8 encontram-se descritas as bactérias mesofílicas isoladas de lodo de esgoto à 28 e 37 °C. Verifica-se que a grande maioria das bactérias isoladas são de origem patogênica, que mesmo após o tratamento do lodo de esgoto com solo em diferentes quantidades, ainda persistem mesmo quando o solo é tratado com 70 t/hac. A *Escherichia coli* foi detectada em ambas as temperaturas testadas, sendo um sinal de alerta, pois a mesma é considerada um microrganismo indicador da presença de coliformes fecais em diversos ambientes (EDRINGTON *et al.*, 2009; MANSILHA *et al.*, 2009; ARTHURSON, 2008).

RESUMO

O lodo de esgoto é um resíduo gerado durante o processo de tratamento biológico de águas residuárias, sendo rico em matéria orgânica e nutrientes para as plantas e os microrganismos. A contaminação do solo com metais pesados contidos no lodo de esgoto pode resultar na diminuição da diversidade genética e provocar alterações da estrutura das comunidades microbianas. As bactérias são microrganismos abundantes na microbiota presente no solo, e são responsáveis por diversas transformações enzimáticas existentes, que auxiliam os processos de decomposição e mineralização de diversos elementos químicos. Este trabalho teve como objetivo o isolamento, identificação e detecção de enzimas hidrolíticas (amilase e urease) das bactérias mesofílicas presentes. O lodo de esgoto foi coletado na Estação de Tratamento de Esgoto da Mangueira, Recife-PE e o solo coletado na Estação Experimental de Itapirema-IPA, município de Goiana-PE. O isolamento foi realizado através da utilização da Técnica da Diluição Seriada e as identificações feitas através da observação das características macroscópicas e microscópicas dos isolados, crescimento em meios de cultura específicos e as colorações de Gram e de esporos. As enzimas hidrolíticas foram detectadas pela metodologia. Os resultados obtidos demonstraram que a temperatura de 28 °C, foi a que obteve uma maior quantidade total de isolados (259 sendo 129 amostras em meios com NaCl e 130 amostras sem NaCl), quando comparada à temperatura de 37 °C que apresentou no total 195 isolados (sendo 92 amostras em meios com NaCl e 103 amostras sem NaCl). Em ambas as temperaturas foram encontrados microrganismos patogênicos (*Escherichia coli*, *Shigella sp*, *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp*, *Enterobacter sp*) possivelmente provenientes do tratamento do lodo de esgoto. Nos ensaios enzimáticos, os melhores resultados foram obtidos à 28 °C,

onde foi obtido uma produção de amilase em todos os isolados testados, tendo o *Streptococcus sp (UCP 0120)* obtido um halo de 70 mm. A detecção de urease foi observada em ambas as temperaturas testadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Federação Internacional das Universidades Católicas (FIUC), CAPES e CNPq.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTHURSON, V. Proper Sanization of Sewage Sludge: A Critical Issue for a Sustainable Society. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 74, n. 17, p. 5267-5275, 2008.

AGUSTINI, D.; ONOFRE, S.B. Caracterização físico-química e microbiológica do lodo de esgoto produzido na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Pato Branco –PR. **Biology & Health Journal**, v.1, n.1/2, p.85- 92, 2007.

AN, Y.J.; KIM, M. Effect of antimony on the microbial growth and the activities of soil enzymes. **Chemosphere**, v.74, p.654-659, 2009.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. (Eds.) **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 312 p., 2000.

BURGESS, J.E.; PLETSCHKE, B.I. **Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment**: A mini-review. **Water SA**, v.34, n.3, p.343-350, 2008.

CALDWELL, B.A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. **Pedobiologia**, v.49, p.637-644, 2005.

CAMPOS, F.S.; ALVES, M.C. Uso de lodo de esgoto na reestruturação de solo degradado, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1389-1397, 2008.

CENCIANI, K.; FREITAS, S. S.; CRITTER, S. A. M.; AIROLDI, C. Microbial enzymatic activity and thermal effect in a tropical soil treated with organic materials. **Science Agrícola**, v.65, n.6, 674-680, 2008.

COLODRO, G.; ESPINDOLA, C. R.; CASSIOLATO, A. M. R.; ALVES, M. C. Atividade microbiana em um Latossolo degradado tratado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.2, p.195-198, 2007.

DUDLEY, D. J.; GUENTZEL, M. N.; IBARRA, M. J.; MOORE, B. E.; SAGIK, B. P. Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. **Applied and Environmental Microbiology**, p.118-126, 1980.

EDDRINGTON, T.S.; LONG, M.; ROSS, T.T.; THOMAS, J.D.; CALLAWAY, T.R.; ANDERSON, R.C.; CRADDOCK, F.; SALISBURY, M.H. e NISBET, D.J. Prevalence and Antimicrobial Resistance Profiles of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Isolated from Feedlot Lambs. **Journal of Food Production**, v. 72, p. 1713-1717, 2009.

GIANFREDA, A.; RAO, M. A.; SANNINO, F.; SACCOMANDI, F.; VIOLANTE, A. Enzymes in soil: properties, behavior and potential applications. **Developments in Soil Science**, v.28B, p.301-327, 2002.

GILLER, K.E.; WITTER, E.; McGRATH, S.P. Heavy metals and soil microbes. **Soil Biology & Biochemistry**, p.1-7, 2009.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, p.597-607, 1979.
IMAMURA, A.; YUMOTO, T.; YANAI, J. Urease activity in soil as a factor affecting the succession of ammonia fungi. **Journal of Florest Research**, v.11, p.131-135, 2006.

JEZIERSKA-TYS, S; FRAC, M. Effect of sewage sludge on selected microbiological and biochemical indices of soil fertility in view of domestic and world wide studies: a review, **Acta Agrophysica**, v.12, n.2, p.393-407, 2008.

KIZILKAYA, R.; BAYRAKH, B. Effects of N- enriched sewage sludge on soil enzyme activities. **Applied Soil Ecology**, v.30, p.192-202, 2005.

KITAMURA, A. E; ALVES, M. C.; SUZUKI, L. G. A. S; GONZALEZ, A.P. Recuperação de um solo degradado com a aplicação de adubos verdes e lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.1, p.405-416, 2008.

KLOSE, S.; TABATABAI, M.A. Urease activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. **Biological and Fertility of Soils**, v.31, p.191-199, 2000.

KONOPKA, A.; FURBACHER, P.; GEDNEY, C. Guia de Identificação de Bactérias – Simulação Computadorizada, cd room, 2000.

LAMBAIS, M.R.; DO CARMO, J.B. Impactos da aplicação de biossólidos na microbiota de solos tropicais, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1129-1138, 2008.

LEITA, L.; DENOBILI, M.; MUHLBACHOVA, G.; MONDINI, C.; MARCHIOL, L.; ZERBI, G. Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation, **Biology and Fertility of Soils**, v.19, p.103-108, 1995.

LEITE, V.D.; LOPES, W. S.; DE SOUSA, J. T.; PRASAD, S.; SILVA, S.A. Tratamento anaeróbio de resíduos sólidos orgânicos com alta e baixa concentração de sólidos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.2, p.190–196, 2009.

LIU, B.R.; JIA, G.M.; CHEN, J.; WANG, G. A review of methods for studying microbial diversity in soils. **Pedosphere**, v.16, n.1, p.18-24, 2006.

MAKOL, J. H. J. R.; NDAKIDEMI, P. A. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, v.3, n.7, p.181-191, 2008.

MANSILHA, C.R.; COELHO, C.A.; HEITOR, A.M.; AMADO, J. e MARTINS, J.P. Bathing Waters: New directive, new Standards, new quality approach. **Marine Pollution Bulletin**, v.58, p.1562-1565, 2009.

MATSUOKA, M.; MENDES, I.C.; LOUREIRO, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.879-885, 2008.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases—an overview. **Carbohydrate Polymers**. v.60, p.163–173. 2005.

NWUCHE, C. O.; UGOJI, E. O. Effects of heavy metal pollution on the soil microbial activity. **Journal Environmental Science and Technology**, v.5, n.2, p.409-414, 2008.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.27, n.1, p.61-66, 2007.

PASSOS, S.R.; REIS JUNIOR, F.B.; RUMJANEK, N.G.; MENDES, I.C.; BAPTISTA, M.J.; XAVIER, G.R. Atividade enzimática e perfil da comunidade bacteriana em solo submetido à solarização e biofumigação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.879-885, 2008.

PRAKASH GOUD, M. J.; SURYAM, A.; LAKSHMIPATHI AND, V. M. A.; CHARYA, S. Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.3, p.354-360, 2009.

RANJARD, L.; RICHAUME, A. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. **Research Microbiology**, v.152, p.707-716, 2001.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: **Legis Summa**, 412 p, 2004.

SANTAMARIA, J.; TORANZOS, G.A. Enteric pathogens and soil: a short review. **International Microbiology**, v.6, p.5-9, 2003.

SIDHU, J. P.S.; TOZE, S.G. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. **Environment International**, v.35, n.1, p.187-201, 2009.

SILVEIRA, R.B.; MELLONI, R.; PEREIRA, E. G. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, no sul de Minas Gerais. **Revista de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.2, n.2, p.21-29, 2004.

SINGH, R.P.; AGRAWAL, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. **Waste Management**, v.28, p.347-358, 2008.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Alpha amylases from microbial sources – An overview on recent developments. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, n.2, p.173-184, 2006.

SMITH, S.R. A review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. **Environmental International**, v.35, p.142-156, 2009.

TORSVIK, V.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v.17, p.170-178, 1996.

VAN DER MAAREL et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, p. 137–155, 2002.

VIG, K.; MEGHARAJ, M.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: A review, **Advances Environmental Residue**, v.8, p.121-135, 2003.

WAGNER, M.; LOY, A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.218-227, 2002.

WARDLE, D.A. The influence of biotic interactions on soil biodiversity. **Ecology Letters**, v.9, p.870-886, 2006.

WYSZKOWSKA, J.; WYSZKOWSKI, M. Effect of Cadmium and Magnesium on Microbiological Activity in Soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, v.11, n.5, p.585-591, 2002.

ANEXOS

Tabela 1- Isolamento de bactérias mesofílicas à 28 °C

Amostra (t/hac)	Com NaCl	Sem NaCl
0	28	40
25	28	26
50	36	21
75	37	43
TOTAL	129	130
Bactérias isoladas		259

Tabela 2- Isolamento de bactérias mesofílicas à 37 °C na presença e ausência de NaCl

Amostra (t/hac)	Com NaCl	Sem NaCl
0	33	32
25	21	22
50	20	15
75	18	34
TOTAL	92	103
Bactérias isoladas		195

Tabela 3 – Identificação das bactérias mesofílicas selecionadas e isoladas de lodo de esgoto e amostras tratadas à 28 °C

Amostra	Procendência (t/hac)	Gênero
0198	75	<i>Alcaligenes sp</i>
0188	0	<i>Alcaligenes sp</i>
0136	50	<i>Alcaligenes sp</i>
0122	0	<i>Alcaligenes sp</i>
0133	0	<i>Bacillus sp</i>
0096	50	<i>Enterobacter sp</i>
0137	0	<i>Enterobacter sp</i>
0118	75	<i>Enterobacter sp</i>
0138	50	<i>Escherichia coli</i>
0140	0	<i>Escherichia coli</i>
0180	50	<i>Escherichia coli</i>
0195	50	<i>Escherichia coli</i>
0194	50	<i>Escherichia coli</i>
0135	50	<i>Escherichia coli</i>
0132	0	<i>Pseudomonas sp</i>
0191	25	<i>Pseudomonas sp</i>
0192	25	<i>Serratia sp</i>
0139	0	<i>Serratia sp</i>
0099	0	<i>Shiguella sp</i>
0095	0	<i>Shiguella sp</i>
0141	0	<i>Shiguella sp</i>
0098	25	<i>Shiguella sp</i>
0120	75	<i>Streptococcus sp</i>

Tabela 4 – Identificação das bactérias mesofílicas selecionadas e isoladas de lodo de esgoto e amostras tratadas à 37 °C.

Amostra	Procendência (t/hac)	Gênero
0174	75	<i>Escherichia coli</i>
0113	25	<i>Escherichia coli</i>
0182	25	<i>Escherichia coli</i>
0146	75	<i>Alcaligenes sp</i>
0145	50	<i>Escherichia coli</i>
0116	0	<i>Shiguella sp</i>
0102	0	<i>Escherichia coli</i>
0183	75	<i>Actinomyces</i>
0148	75	<i>Escherichia coli</i>
0180	75	<i>Bacillus sp</i>
0172	75	<i>Shiguella sp</i>
0173	25	<i>Shiguella sp</i>
0173	25	<i>Actinomyces</i>
0176	75	<i>Escherichia coli</i>
0177	25	<i>Actinomyces</i>
0179	75	<i>Escherichia coli</i>

Tabela 5 – Caracterização química do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE

Elementos Químico	Teor Encontrado (mg/Kg)
Ca	1180 ± 0,02
Mg	755 ± 0,004
Al	14600 ± 0,3
Zn	600 ± 0.01
Cu	909.8 ± 0.001
Ni	10 ±0,01
Cd	2,2 ± 0.0004
Fe	2390 ± 0,2
Mn	189 ± 0,003
Cr	22 ± 0,001

Tabela 6 – Detecção de amilase e urease em amostras de bactérias mesofílicas isoladas à 28 °C

Amostra	Amilase halos (mm)	Urease
<i>Enterobacter sp (UCP 0137)</i>	42	(+)
<i>Bacillus sp (UCP 0119)</i>	42	(-)
<i>Serratia sp (UCP 0139)</i>	27	(+)
<i>Shigella sp (UCP 0099)</i>	64	(+)
<i>Streptococcus sp (UCP 0120)</i>	70	(-)
<i>Staphylococcus aureus (UCP 0095)</i>	66	(-)
<i>Escherichia coli (UCP 0140)</i>	64	(+)
<i>Pseudomonas sp (UCP 0206)</i>	47	(+)
<i>Serratia sp (UCP 0192)</i>	52	(-)
<i>Escherichia coli (UCP 0123)</i>	50	(-)

(-) não detectado; (+) mudança intensa de coloração

Tabela 7 – Detecção de amilase e urease em amostras de bactérias mesofílicas isoladas à 37 °C

Amostra	Amilase halos (mm)	Urease
<i>Alcaligenes sp (UCP 0183)</i>	(-)	(-)
<i>Shigella sp (UCP 0109)</i>	(-)	(+)
<i>Alcaligenes sp (UCP 0177)</i>	(-)	(-)
<i>Escherichia coli (UCP 0174)</i>	(-)	(+)
<i>Shigella sp (UCP 0173)</i>	(-)	(+)
<i>Escherichia coli (UCP 0178)</i>	(-)	(+)
<i>Escherichia coli (UCP 0176)</i>	(-)	(+)

(-) não detectado; (+) mudança intensa de coloração

Tabela 8 – Isolamento e Identificação de bactérias mesofílicas isoladas de lodo de esgoto à 28 e 37 °C

Amostra	Temperatura (°C)	Gênero
0174	28	<i>Escherichia coli</i>
0113	28	<i>Escherichia coli</i>
0182	37	<i>Escherichia coli</i>
0146	28	<i>Alcaligenes sp</i>
0145	37	<i>Escherichia coli</i>
0116	28	<i>Shiguella sp</i>
0102	37	<i>Escherichia coli</i>
0183	28	<i>Actinomyces</i>
0148	37	<i>Escherichia coli</i>
0180	28	<i>Bacillus sp</i>
0172	28	<i>Shiguella sp</i>
0173	37	<i>Shiguella sp</i>
0120	28	<i>Streptococcus sp</i>
0176	37	<i>Escherichia coli</i>
0192	37	<i>Serratia sp</i>
0179	28	<i>Escherichia coli</i>

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

- Foram isoladas 195 bactérias mesofílicas a 37°C, sendo que 12 amostras em meios contendo NaCl e 103 amostras em meios na ausência de NaCl ;
- Foras isoladas 259 bactérias mesofílicas a 28°C sendo 129 amos em meio contendo NaCl e 30 amostra sem a presença de NaCl ;
- Na detecção de metais presentes no lodo de esgoto, foi evidenciada uma baixa concentração de cádmio (2,2 mg/Kg) e de níquel (10 mg/Kg) e uma alta concentração de alumínio (14600 mg/Kg), cálcio (1180 mg/Kg), cobre (909,8 mg/Kg) e zinco (600 mg/Kg);
- Foram detectadas em ambas as temperaturas de isolamento, bactérias patogênicas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Shigella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp*, *Streptococcus sp*, *Alcaligenes sp*);
- Na detecção de amilase, os melhores resultados foram obtidos nas amostras de bactérias mesofílicas isoladas 28°C, onde todas apresentaram a formação do halo característico, sendo o melhor resultado foi obtido com a amostra de *Streptococcus sp* (UCP 0120), que apresentou um halo de 70 mm;
- Na detecção de urease, os melhores resultados foram obtidos nas amostras isoladas à 37 °C, onde das 7 amostras testadas, 5 amostras apresentaram a mudança de coloração característica da enzima e apenas duas não apresentaram;
- A presença de NaCl nos meios não teve uma influência significativa quantitativo n o isolamento de bactérias mesofílicas em diferentes temperaturas;
- Através dos resultados obtidos no isolamento e identificação das bactérias mesofílicas presentes no lodo de esgoto, foi verificada a presença de uma

grande quantidade de bactérias patogênicas, principalmente de origem fecal, que mesmo após o tratamento com o solo com diferentes concentrações, permaneceram nos solos tratados em diferentes doses e temperaturas.

Instruções da Revista *Brazilian Archives of Biology and Technology*

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Submission of papers: *Brazilian Archives of Biology and Technology* publishes original research papers, Short notes and Review articles in English in the interdisciplinary areas of biological sciences and engineering/technology. Submission of paper implies that it has not been published or being considered for publication elsewhere. Care should be taken to prepare a compact manuscript with precision in presentation, which will help authors in its acceptance. All the papers are subjected to review by referees.

Manuscript: Three copies of the single-spaced typed manuscript (maximum 12 pages for original and review articles and 2-4 pages for short notes) on a high grade A-4 size paper (210x297 mm), with margins (left 25, right 20, superior and inferior 30 mm) should be prepared. This should be divided under the following headings: ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS, RESUMO, REFERENCES. These headings should be typed in bold upper case (12 font). For review articles, authors should make their own headings along with Abstract and Introduction.

Title: The title (18 font, bold) of the paper should clearly reflect its contents. It should be followed by the name(s) of author(s) with expanded initials (12 font, bold) and the address(s) (*italic*, 10 font) of the institution(s) where the work has been carried out.

ABSTRACT: Each paper should be provided with an abstract (*italic*) of 100-150 words, describing briefly on the purpose and results of the study. It should be prepared as concisely as possible.

Key words: Authors should provide three to six key words that will be used in indexing their paper.

INTRODUCTION: This should describe the background and relevant information about the work. It should also state the objective of the work.

MATERIALS AND METHODS: Authors must take care in providing sufficient details so that others can repeat the work. Standard procedures need not be described in detail.

RESULTS AND DISCUSSION: Results and Discussion may be presented separately or in combined form (authors may decide easier way for them). Preliminary work or less relevant results are not to be described. The reproducibility of the results, including the number of times the experiment was conducted and the number of replicate samples should be stated clearly.

RESUMO: An abstract of the paper should also be prepared in Portuguese and placed before the list of References. Authors from other than Latin American countries can seek the help of Editor's office to prepare Portuguese resumo of their papers.

REFERENCES: References in the text should be cited at the appropriate point by the name(s) of the author(s) and year (e.g. Raimbault & Roussos, 1996; Raimbault *et al.*, 1997). A list of references, in the alphabetic order (10 font), should appear at the end of the manuscript. All references in the list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished results should not be included in the list. Examples of references are given below.

In journals:

Pandey, A. (1992), Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem.*, **27**, 109-117.

Thesis:

Chang, C. W. (1975), Effect of fluoride pollution on plants and cattle. PhD Thesis, Banaras Hindu University, Varanasi, India.

In books:

Tengerdy, R. P. (1998), Solid substrate fermentation for enzyme production. In-*Advances in Biotechnology*, ed. A. Pandey. Educational Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13-16.

Pandey, A. (1998), *Threads of Life*. National Institute of Science Communication, New Delhi. In *conferences*:

Davison, A. W. (1982), Uptake, transport and accumulation of soil and airborne fluorides by vegetation. Paper presented at 6th International Fluoride Symposium, 1-3 May, Logan, Utah.

Tables and Figures: Tables and figures, numbered consecutively with arabic numerals must be inserted at appropriate place in the text. These should be used to present only those data, which can not be described in the text.

Units and Abbreviations: The SI system should be used for all experimental data. In case other units are used, these should be added in parentheses. Only standard abbreviations for the units should be used. Full stop should not be included in the abbreviation (e.g. m, not m. or rpm, not r.p.m.). Authors should use '%' and '/' in place of 'per cent' and 'per'.

Manuscript lay-out: It is suggested that authors consult a recent issue of the journal for the style and layout. Except the title, abstract and key words, entire text should be placed in two columns on each page. Footnotes, except on first page indicating the corresponding author (8 font) should not be included. The entire manuscript should be prepared in Times New Roman, 11 font (except reference list, which should be in 10 font).

Spacing: Leave one space between the title of the paper and the name(s) of the author(s), and between the headings and the text. No space should be left between the paragraphs in the text. Leave 0.6-cm space between the two columns.

Electronic submission: Manuscript should be accompanied by a diskette indicating the name and version of the word processing programme used (use only MS Word 6/7 or compatible).

Referees: When submitting the manuscript authors may suggest up to three referees, preferably from other than their own countries, providing full name and address with email. However, the final choice of referees will remain entirely with the Editor.

Page charges and reprints: There will be no page charges. Reprints can be ordered up on acceptance of the paper. Manuscripts and all correspondence should be sent to the Editor: Prof. Dr. Carlos R. Soccol ***Brazilian Archives of Biology and Technology*** Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775-CIC 81350-010 Curitiba-PR, Brazil Fax +55-41-247 67 88 Email:niet@tecpar.br.

