

Sandra Rebeca Oliveira Martins¹
Jade Oliveira Abreu²
Daniel Rodrigues dos Santos³
Fátima Cristiane Teles de Carvalho⁴
Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira⁵
Oscarina Viana de Sousa⁶
Instituto de Ciências do Mar – Labomar/
Universidade Federal do Ceará

Rosa Helena Rebouças⁷
Universidade Federal do Piauí
becamartins@yahoo.com.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Endereço: BR-153 – Quadra Área
75.132-903 – Anápolis – revista.prp@ueg.br

GERÊNCIA DE PESQUISA

Coordenação de Projetos e Publicações

Artigo original
Recebido em: 08/12/2015
Avaliado em: 30/01/2017
Publicado em: 21/04/2017

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO DA CAATINGA

RESUMO

As proteases compõem um grupo variado de enzimas catalíticas que desempenham importante papel nos processos fisiológicos e aplicação em processos industriais. É crescente o interesse por enzimas provenientes de microrganismos devido à sua diversidade, complexidade e seu elevado potencial biotecnológico. A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, com ambientes ricos em espécies que apresentam adaptações únicas. Porém, a microbiota do solo da caatinga e seu potencial biotecnológico ainda são pouco explorados. O objetivo do presente trabalho foi quantificar e isolar bactérias produtoras de proteases a partir de amostras de solo da caatinga. Dentre os isolados bacterianos produtores de proteases extracelulares, dois se destacaram por apresentarem eficiência enzimática em diferentes condições de temperatura e pH. As bactérias isoladas do solo da caatinga mostraram-se resistentes às condições extremas do bioma e apresentaram ótima atividade enzimática nas amplas variações de temperatura e pH testadas, indicando potencial para uso biotecnológico.

Palavras-Chave: Protease, biotecnologia, caseinase, enzimas proteolíticas, semiárido.

Abstract

The proteases comprise a diverse group of catalytic enzymes that perform an important role in physiological processes and industrial applications. Interest in enzymes from microorganisms is growing because of its diversity, complexity and its high biotechnological potential. Caatinga is a biome exclusively from Brazil with environments rich in species that exhibit unique adaptations. The soil microbiota of the Caatinga and its biotechnological potential are still unexplored. The aim of this study was to quantify and isolate protease-producing bacteria from Caatinga soil samples. Among the protease-producing bacteria isolated, two strains showed enzymatic efficiency in different conditions of temperature and pH. The bacteria isolated from Caatinga soil were resistant to extreme biome conditions and showed high enzymatic activity in wide variations of temperature and pH tested, indicating potential for biotechnological use.

Keywords: Protease, Biotechnology, Caseinase, proteolytic and semiarid region.

1. INTRODUÇÃO

A Caatinga possui uma área de 750.000 km², ocupa cerca de 11 % de todo o território nacional e 54 % do nordeste brasileiro, sendo considerado o bioma mais importante dessa região (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009; ANDRADE et al., 2005).

Apesar de apresentar rica biodiversidade, alta variedade de espécies endêmicas e heterogeneidade, é considerado extremamente frágil (ALVES, 2007). Devido à carência de conhecimento técnico-científico a respeito desse bioma, por muito tempo foi considerado um ecossistema bastante pobre. Dentre os biomas brasileiros, a caatinga é um dos mais alterados e degradados devido a atividades antrópicas (GOMES et al., 2012).

Os microrganismos no solo são fortemente influenciados por vários fatores químicos e físicos, incluindo a disponibilidade de nutrientes, matéria orgânica, umidade e temperatura (BLOEM et al., 1992; WARDLE, 1998). Em ambientes áridos como a Caatinga, esses fatores são geralmente desfavoráveis para o desenvolvimento microbiano. A escassez hídrica pode ser o principal fator estressor sobre a diversidade e atividade das populações bacterianas (SCHIMEL, 1995; GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007).

As bactérias constituem o principal grupo de decompositores, sendo responsáveis pela ciclagem de carbono, principalmente, devido à sua capacidade de produzir enzimas extracelulares que degradam compostos complexos e macromoléculas (GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007). Os microrganismos em geral podem ser bons produtores de proteases, uma vez que possuem uma grande diversidade bioquímica e também uma fácil manipulação genética (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011; NASCIMENTO; MARTINS, 2006).

As proteases são enzimas que degradam proteínas (POLLARO et al., 2012) e estão presentes em diversos processos fisiológicos que demandam enzimas proteolíticas com especificidade variada, que vai desde proteases digestivas, responsáveis por quebrar os resíduos hidrofóbicos ou positivamente carregados (peptídeos bioativos), até proteases que reconhecem e quebram uma única proteína (HEDSTROM, 2002). Sua importância em conduzir as funções metabólicas e regulatórias essenciais é evidenciada pela sua ocorrência em todas as formas de organismos vivos (TREMACOLDI, 2008). As proteases são a classe de enzimas que apresenta importante papel quanto às suas aplicações no campo fisiológico e comercial, estando entre os maiores grupos de enzimas industriais (HEDSTROM, 2002; RAWLING, 1994).

Devido à sua diversidade estrutural e mecanismos de ação, estas enzimas apresentam relevância bioquímica e são utilizadas na indústria de detergentes, de alimentos, de têxteis, farmacêutica, entre outras, além disso, é crescente o interesse por estas para uso como produtos terapêuticos de última geração (VERMELHO et al., 2008).

Essa pesquisa teve como objetivos a quantificação e isolamento de bactérias produtoras de enzimas proteolíticas extracelulares a partir de solo do bioma da Caatinga e a avaliação da eficiência e estabilidade das enzimas sob condições variáveis de pH e temperatura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de solo foram coletadas no município de Morada Nova, Ceará, Brasil em ponto localizado dentro do bioma da Caatinga, especificamente na Latitude: 5°00'47" S e Longitude: 38°23'14" W.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP), no Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR/UFC, onde foram processadas e analisadas.

Processamento das amostras

Foram pesados 10 g de sedimento e diluídos em 90 mL de solução salina 0,85 %. Esta correspondeu à diluição 10^{-1} ; a partir dela foram preparadas diluições seriadas até a diluição 10^{-5} .

Para a quantificação das populações de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) foi utilizado o método de contagem padrão em placa (CPP) utilizando o meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA) (DOWNES; ITO, 2001). Para as quantificações de BHC e bactérias proteolíticas (BP) foi utilizada a técnica da semeadura em profundidade - *Pour Plate*. O procedimento foi feito em duplicata e as placas foram incubadas em estufa a 35°C por 48h.

Para verificar a presença de bactérias produtoras de protease, foi utilizado o meio de cultura específico *Ágar Caseína do Leite* (ACL) e consideradas apenas as colônias que apresentaram formação de halo transparente, que é um indicador da produção da enzima (THYS, 2004).

Morfologia das colônias

As colônias crescidas nos meios utilizados foram analisadas quanto às diferentes características morfológicas (tamanho e coloração) bem como a formação de halo no Ágar Caseína do Leite para, em seguida, serem isoladas e purificadas.

Para verificar a ação proteolítica, foram isoladas as cepas que apresentaram halo no ACL ao redor da colônia, indicando potencial para sua utilização na biotecnologia. A formação da zona mais clara em torno da colônia bacteriana, que pode ser devido à hidrólise da caseína, indicou resultado positivo para produção da protease. Portanto, essas cepas foram consideradas como proteolíticas (KUBERAN; SANGARALINGAM; THIRUMALAIARASU, 2010; KUMAR et al., 2012).

Isolamento

Os isolados bacterianos foram inoculados em tubos contendo meio Ágar Triptona de Soja (TSA), com crescimento em estufa a 35 °C por 24 h. No total, foram isoladas 10 cepas caseinase positivas.

Extração do líquido metabólico

Para otimizar a produção das proteases, as cepas bacterianas foram inoculadas em Caldo Caseína do Leite (CCL) e incubadas a 35 °C por 24 h, sob agitação 0,4039 g. Em seguida, as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C com rotação de 2236 g (5000 RPM em centrífuga com raio de 8 cm) (NASCIMENTO; MARTINS, 2006).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® 0,22 µm para a retirada das células, sendo o material filtrado congelado e armazenado em freezer a -18 °C (KAWAMOTO; LORBEER, 1976).

Avaliação da estabilidade das enzimas

Condições extremas de temperatura:

Em temperatura ambiente, foi feita a distribuição de 0,5 µL do líquido metabólico em microtubos e em seguida, foram incubados nas temperaturas de 4 °C (freezer) e 70 °C (banho-maria).

As amostras do líquido metabólico das cepas bacterianas foram separadas em alíquotas em microtubos, divididas em dois grupos e expostas às temperaturas de 4 °C

(freezer) e 70 °C (banho-maria). A cada 30 min foram retiradas alíquotas para testar a atividade das enzimas. Foram testados os tempos T_0 , T_{30} , T_{60} , T_{90} , T_{120} , T_{150} e T_{180} , perfazendo um total de sete tempos para cada cepa.

Para a análise da atividade enzimática, foram inoculados 0,5 µL do líquido metabólico em poços em Ágar gelatina e incubados em estufa BOD a 20 °C por 24 h. A deformação do poço e espalhamento do inóculo no meio de cultura indicou presença de atividade enzimática (OLIVEIRA; FOPPA, 2014).

Condições extremas de pH:

A atividade enzimática também foi analisada em dois diferentes valores de pH: 5,2 (ácido) e 8,5 (básico). Esses valores foram obtidos através das soluções de ácido clorídrico e acetato de sódio.

Foram utilizadas soluções tamponantes de acetato de sódio, pH 5,5; e Tris/HCl, pH 8,5 a 10,0. Os valores de pH da mistura da reação foram ajustados com NaOH ou HCl.

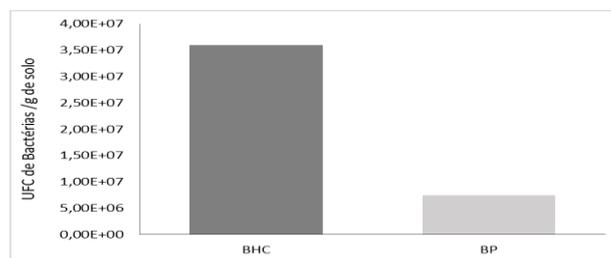
Para o teste de atividade enzimática, foram acrescentados em microtubos 0,5 µl do líquido metabólico e 0,5 µl da solução (ácida ou básica), numa proporção de 1:1. As soluções foram mantidas em temperatura ambiente. Alíquotas também foram retiradas em intervalos de 30 minutos ao longo dos sete tempos estabelecidos para os testes. A atividade da enzima foi verificada através da deformação do Ágar Caseína do Leite.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação das BHC e das BP contidas nas amostras de solo coletadas no bioma da caatinga estão apresentadas na Figura 1. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias heterotróficas e de bactérias proteolíticas foi de $3,6 \times 10^7$ UFC/g e $7,5 \times 10^6$ UFC/g, respectivamente.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram superiores aos resultados encontrados por Lima et al. (2014) que, estudando amostras do solo em diferentes tipos de vegetação do semiárido brasileiro para verificar a abundância de populações cultiváveis, encontraram contagem média de BHC de 5×10^6 UFC/g na amostra da Caatinga natural.

Figura 1: Média das contagens padrão em placas de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis e Bactérias Proteolíticas nas amostras de solo da caatinga.



A relação entre as populações total de bactérias cultiváveis encontradas no solo e as bactérias proteolíticas foi de 0,208, o que representa aproximadamente 21 % da contagem de BHC da amostra de solo, sendo esse valor muito inferior aos encontrados por Sanomiya e Nahas (2003) – 69,9% – e Gorlach-Lira e Coutinho (2007) – 93%, em solos secos do Cerrado mineiro e da Caatinga paraibana, respectivamente.

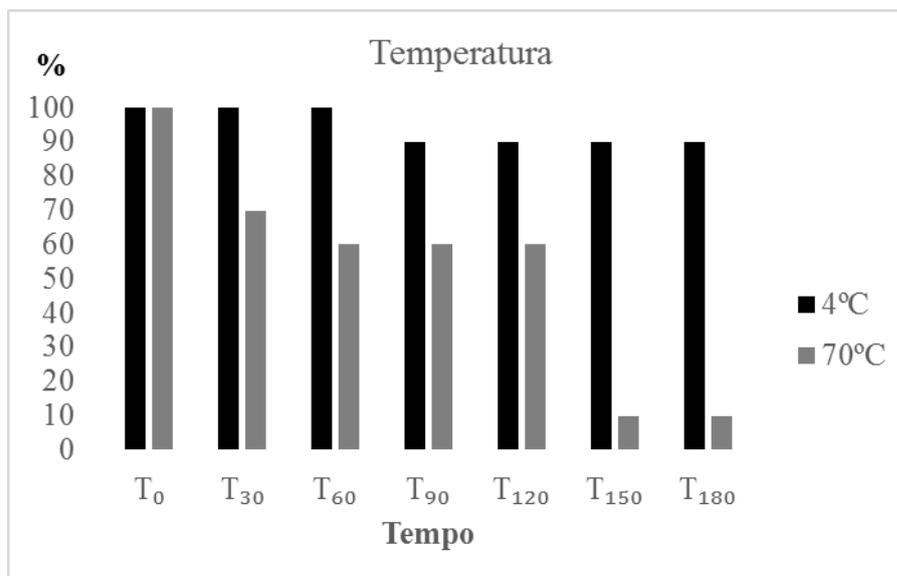
Sanomiya e Nahas (2003) concluíram que o número de bactérias proteolíticas do solo aumenta de acordo com a aplicação de nutrientes, ou seja, com adubação do solo, o que não se aplica ao ambiente amostrado neste trabalho.

Segundo Ferreira et al. (2010), o tipo de solo, bem como a profundidade deste, são fatores que podem influenciar nas atividades e na composição microbiana. Além das características químicas e bioquímicas do solo, os fatores abióticos, como umidade e temperatura, também interferem na quantificação de bactérias presentes (FERREIRA; STONE; MARTIN-DIDONET, 2016).

A estabilidade das enzimas extracelulares produzidas pelas cepas isoladas também foi avaliada. A Figura 2 apresenta o comportamento da atividade enzimática quando submetida às duas temperaturas extremas, 4 °C e 70 °C por até 6 horas (T_{180}).

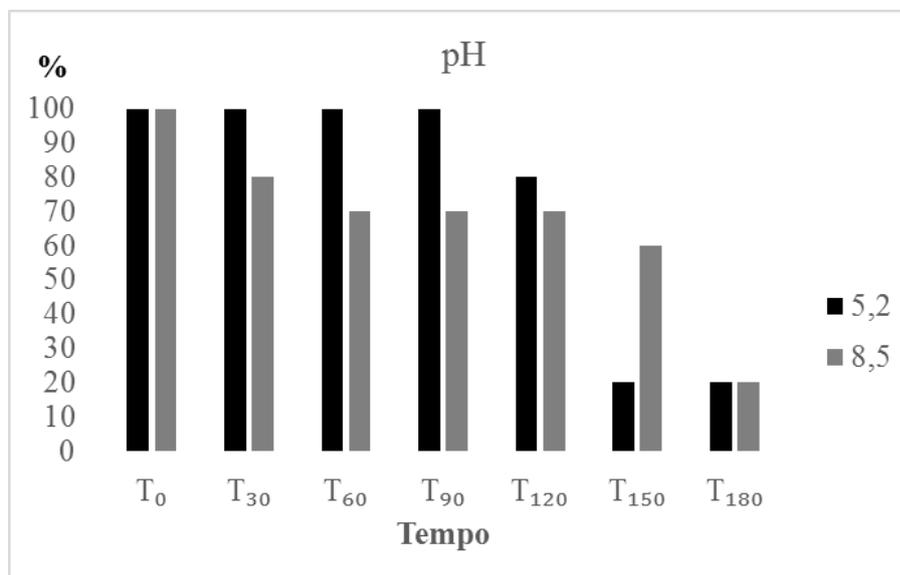
A temperatura de 4 °C apresentou a maior atividade enzimática para todos os tempos testados (T_0 a T_{180} minutos), enquanto a temperatura de 70 °C apresentou menor atividade, principalmente, nos tempos T_{150} e T_{180} . Esses resultados discordam daqueles obtidos por Nascimento e Martins (2006), que encontraram um valor máximo de atividade enzimática a uma temperatura de 70 °C ao testarem uma cepa de *Bacillus* sp.

Considerando a origem das cepas, era esperada estabilidade em temperaturas mais elevadas, uma vez que o solo do bioma da Caatinga pode atingir até 60 °C (ANDRADE; SILVA, 2013). De modo geral, a temperatura elevada foi o fator que mais afetou a atividade das enzimas proteolíticas.

Figura 2: Atividade enzimática das amostras em duas diferentes temperaturas.

Do total de cepas isoladas, 20 % apresentaram melhor desempenho, com deformação representativa do ágar, sendo consideradas com muita atividade nos tempos de T₃₀ a T₉₀ (cepa 13) e de T₆₀ a T₁₈₀ (cepa 17).

A Figura 3 apresenta os valores percentuais das cepas que apresentaram atividade enzimática em dois valores distintos de pH, 5,2 e 8,5 respectivamente.

Figura 3. Atividade enzimática das amostras de solo da caatinga em nos dois valores de pH (ácido e básico).

Para os valores de pH testados, a maior atividade enzimática foi observada no pH ácido nos tempos de T₀ a T₁₂₀, enquanto que a condição alcalina apresentou menor atividade enzimática e efeito mais rápido sobre a desnaturação das enzimas.

Trabalhos como de Nascimento e Martins (2006), Chaud, Felipe e Vaz (2007) e Ferreira et al. (2010) indicam como valores de pH para ótima atividade proteolítica os que estão na faixa de 8 a 9, diferindo, portanto, do presente estudo que apresentou maior atividade no pH mais baixo (5,2) por um longo período de tempo.

Assim como ocorreu com os resultados obtidos nos testes de temperatura, para os testes de pH, os resultados alcançados foram o oposto do que era esperado, apresentando maior tempo de resistência em condições de acidez, enquanto que os solos da região em que as amostras deste estudo foram coletadas apresentam fenômenos de alcalinização (BRASIL, 2016).

Apesar de ter sido aplicada no presente trabalho uma adaptação da metodologia utilizada por Nascimento e Martins (2006), os resultados aqui obtidos diferem dos seus. O principal aspecto que pode motivar essa divergência é o ambiente do qual as amostras foram extraídas, uma vez que a atividade da biomassa edáfica é influenciada pelas características do solo (umidade, aeração, pH, textura) e do ambiente (clima, vegetação) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Enquanto as amostras do presente trabalho foram extraídas do município de Morada Nova, Ceará, que se encontra no bioma da Caatinga, as amostras utilizadas por Nascimento e Martins (2006) foram extraídas do município de Campos de Goytacazes, Rio de Janeiro, que se encontra no bioma do Cerrado (SOUZA; MARTINS, 2001).

A Tabela 1 apresenta o desempenho enzimático de cada cepa, ou seja, o tempo de atividade em relação às diferentes condições a que foram expostas.

Tabela 1: Tempo máximo (minutos) de atividade enzimática em relação às diferentes condições simuladas.

Cepas		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Temp	4°C	T ₁₈₀	T ₁₈₀	T ₁₈₀	T ₁₈₀	T ₆₀	T ₁₈₀				
	70°C	T ₁₂₀	T ₁₂₀	T ₁₂₀	T ₁₂₀	T ₀	T ₆₀	T ₁₂₀	T ₀	T ₀	T ₁₈₀
pH	5,2	T ₁₂₀	T ₁₂₀	T ₁₈₀	T ₉₀	T ₉₀	T ₁₂₀	T ₁₈₀	T ₁₂₀	T ₁₂₀	T ₁₂₀
	8,5	T ₁₅₀	T ₁₅₀	T ₁₈₀	T ₁₅₀	T ₁₅₀	T ₁₂₀	T ₁₈₀	T ₀	T ₀	T ₃₀

Na temperatura de 4 °C a maioria das cepas apresentou atividade enzimática em todos os tempos testados (T₀ a T₁₈₀). Apenas uma cepa, dentre as isoladas, apresentou atividade enzimática até o T₆₀.

Para a temperatura de 70 °C verificou-se atividade enzimática nas cepas 11, 12, 13, 14, e 17 até o tempo de 120 minutos (T_{120}); na cepa 16 até T_{60} ; na cepa 20 até T_{180} e nas demais cepas 15, 18 e 19 foram verificadas atividade apenas no tempo inicial (T_0).

Para os testes de pH em caráter ácido (5,2), 60 % das cepas apresentaram atividade enzimática até o T_{120} . Apenas 20 % das cepas apresentaram atividade até T_{90} .

Já no valor do pH alcalino (8,5), 40 % das cepas apresentaram atividade enzimática até T_{150} e 20 % apresentaram atividade somente no tempo inicial (T_0).

Dois isolados (cepas 13 e 17) apresentaram atividade enzimática em todos os tempos testados para os dois valores de pH (ácido e básico). Os mesmos isolados também apresentaram melhor resultado para os testes de temperatura e melhor eficiência na hidrólise da proteína, sendo, portanto, consideradas as cepas com maior potencial para aplicabilidade biotecnológica. Uma vez que, suas enzimas possuem características que lhe proporcionaram maior resistência a condições adversas, o que pode permitir a manutenção da atividade mesmo após passar por processos industriais.

4. CONCLUSÃO

As bactérias isoladas do solo da caatinga apresentaram elevado potencial enzimático com formação de halos no meio Ágar Caseína do Leite.

As enzimas proteolíticas isoladas a partir de bactérias do solo em região de semiárido mostraram-se estáveis a variações ao apresentar uma ótima resistência nas diferentes temperaturas testadas - principalmente na temperatura de 4 °C - e um desempenho considerável nos dois valores de pH. As temperaturas elevadas apresentam maior efeito sobre a estabilidade das enzimas proteolíticas do que temperaturas baixas e condições alcalinas de pH apresentaram um efeito mais rápido sobre a desnaturação dessas enzimas.

Dentre os isolados, foi possível detectar cepas com atividades enzimáticas estáveis para todas as condições testadas, sendo, portanto, de interesses biotecnológicos.

Este trabalho evidencia a importância do estudo da microbiota de diferentes ecossistemas e mostra a necessidade de experimentos para caracterização de bactérias isoladas do solo da caatinga, que sejam produtoras de enzimas.

Agradecimentos:

Ao Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará e ao Laboratório

de Microbiologia Ambiental e do Pescado por conceder o espaço e todo material e equipamentos necessários para realização do trabalho.

5. REFERÊNCIAS

- ALVES, J. J. A. Geoecologia da caatinga no semi-árido do Nordeste brasileiro. CLIMEP: Climatologia e Estudos da Paisagem, Rio Claro, v. 2, n. 1, p. 58-71, 2007.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Caminhos de Geografia**, v. 9, n. 27, p. 143-155, 2009.
- ANDRADE, L. A.; PEREIRA, I. M.; LEITE, U. T.; BARBOSA, M. R. V. Análise da cobertura de duas fitofisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. **Revista Cerne**, v. 11, n. 3, p. 253 - 262, 2005.
- ANDRADE, R. L.; SILVA, F. M. Comportamento energético do sistema vegetação-atmosfera no bioma caatinga. **Sociedade e Território**, v. 25, n. 2, p. 17-28, 2013.
- BLOEM, J.; RUITER, P. C.; KOOPMAN, G. J.; LEBBINK, G.; BRUSSAARD, L. Microbial numbers and activity in dried and rewetted arable soil under integrated and conventional management. **Soil Biology Biochemistry**, v. 24, p. 655-665, 1992.
- BRASIL. DEPARTAMENTO NACIONAL DE OBRAS CONTRA AS SECAS - DNOCS . PERÍMETRO IRRIGADO MORADA NOVA: SOLO. Disponível em: <http://www.dnocs.gov.br/~dnocs/doc/canais/perimetros_irrigados/ce/morada_nova.html>. Acesso em: 19 nov. 2016.
- CHAUD, L. C. S.; FELIPE, M. G.; VAZ, P. V. Considerações Sobre a Produção Microbiana e Aplicações de Proteases. **Nucleus**, v. 4, p. 1-2, 2007.
- DOWNES, M. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4ª edição, v. 1. American Public Health Association, Washington, 2001.
- FERREIRA, E. P. B.; STONE, L. F.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. População e atividade microbiana do solo em sistema agroecológico de produção. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 1, p. 22-31, 2016.
- FERREIRA, J. F.; SBRUZZI, D.; BARROS, K. V. G.; MACHADO, I. S.; TAMBOURGI, E. B. Extração e caracterização de uma enzima proteolítica do curauá (*Ananas Erectifolius*). **Exacta**, v. 8, n. 2, p. 179-184, 2010.
- GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D. Population Dynamics and Extracellular Enzymes Activity of Mesophilic and Thermophilic Bacteria Isolated from Semi-arid soil of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 135-141, 2007.
- HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.
- KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, p. 262-276, 2011.
- KAWAMOTO, S. O.; LORBEER, J. W. Protection of onion seedlings from *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacia*. **Plant Disease Reporter**, v. 60, p. 189-191, 1976.
- KUBERAN, T.; SANGARALINGAM, S.; THIRUMALAIARASU, V. Isolation and optimization of Protease producing Bacteria from Halophilic soil. **Journal of Biological Science Research**, v. 1, n. 3, p. 163-174, 2010.
- KUMAR, S.; KARAN, R.; KAPOOR, S.; SINGH, S. P.; KHARE, S. K. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1595-1603, 2012.
- LIMA, J. V. L.; PINHEIRO, M. S.; GUEDES, L. M. C. Populações microbianas cultiváveis do solo e serrapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 10, n. 18, p. 2300-2316, 2014.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Proteases e inibidores de proteases na interação planta-microrganismo. In: Microbiologia e bioquímica do solo. 2ª edição. Lavras: UFLA, 2006. Cap. 4, p. 163-201.

- NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 582-588, 2006.
- OLIVEIRA, L. P.; FOPPA, T. Produção de Extrato e Avaliação Antimicrobiana de *Scleroderma* sp pelo Método de Difusão em Ágar e Confrontação Direta. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, v. 3, n. 1, p. 49-56, 2014.
- POLLARO, L.; DIDERICH, P.; ANGELINI, A.; BELLOTTO, S.; WEGNER, H.; HEINIS, C. Measuring net protease activities in biological samples using selective peptidic inhibitors. **Analytical biochemistry**, v. 427, n. 1, p. 18-20, 2012.
- SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, v. 33, p. 835-842, 2003.
- SCHIMEL, J. Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. **Ecological Studies**, v. 113, p. 239-254, 1995.
- SOUZA, A. N.; MARTINS, M. L. L. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 271-275, 2001.
- THYS, R. C. S. Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. kr10. Porto Alegre, 2004, 100p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na interação planta-microrganismo. In: PACHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. Interação Planta Patógeno - fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular, 1ª edição. Piracicaba. FEALQ, 2008. Cap. 11, p. 373-386.
- VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N. de; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. dos; D'AVILA-LEVY, C. M.; COURI, S.; BON, E. P. S. Enzimas em biotecnologia-Produção, aplicações e Mercado. In: Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas, 2008. Cap 11, p. 273-287.
- WARDLE, D. A. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: A global - scale synthesis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1627-1637, 1998.