

Atividades amilolíticas de rizobactérias amazônicas em meios de cultura contendo amido de milho (*Zea mays* L.) ou farinha de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart)

Amylolytic activities of Amazonian rhizobacteria in culture media containing corn starch (*Zea mays* L.) or babassu flour (*Orbignya phalerata* Mart)

Actividades amilolíticas de rizobacterias amazônicas en medios de cultivo que contienen almidón de maíz (*Zea mays* L.) o harina de babasú (*Orbignya phalerata* Mart)

Recebido: 17/02/2022 | Revisado: 27/02/2022 | Aceito: 22/03/2022 | Publicado: 29/03/2022

Thaíssa Cunha de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3124-8124>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: thaissa.olcunha@gmail.com

Cassiane Minelli-Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4827-9955>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: cassyminelli@gmail.com

Nadionara Costa Menezes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9716-0822>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: nadionaracosta@gmail.com

Suziane Pinto Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5991-7716>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: rodrigues.suzi1996@gmail.com

José Carlos Ipuchima da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3628-7985>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: carlos.silva.jcids@gmail.com

Luiz Antonio de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2008-7292>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: luiz.oliveira@inpa.gov.br

Resumo

Avaliar a presença de amilases em rizobactérias é muito importante, uma vez que o amido pode ser usado como matéria prima para a produção de bioprodutos de importância econômica. Ênfase deve ser dada para aquelas que possam usar o amido da farinha do babaçu, fortalecendo a cadeia produtiva dessa palmeira ignorada pela bioeconomia amazônica. Com essa finalidade, foram testadas 40 rizobactérias em meio de cultura contendo o amido de milho ou a farinha de babaçu. Todas mostraram habilidade para crescerem nos dois meios de cultura, mas houve uma diferença muito grande entre elas, mostrada pelos diâmetros de suas colônias no quinto dia de crescimento. Das 40 rizobactérias, 19 mostraram produção de amilase no meio contendo amido de milho e 16 no meio contendo farinha de babaçu. As bactérias amilolíticas apresentam potencial para serem usadas na degradação de amido para fins biotecnológicos. São necessários mais estudos para selecionar as melhores para essa finalidade, tais como efeito do pH, temperatura e, a eficiência de conversão do amido do milho e da farinha do babaçu em produtos de características biotecnológicas desejáveis.

Palavras-chave: Amilases; Metabolismo microbiano; Microbiota amazônica; Atividade enzimática.

Abstract

Assessing the presence of amylases in rhizobacteria is very important, since starch can be used as a raw material for bioproducts production of economic importance. Emphasis should be given to those that can use the starch from babassu flour, strengthening the production chain of this palm tree ignored by the Amazon bioeconomy. For this purpose, 40 rhizobacteria were tested in a culture medium containing corn starch or babassu flour. All showed the ability to grow in the two-culture media, but there was a very large difference between them, shown by the diameters of their colonies on the fifth day of growth. Of the 40 rhizobacteria, 19 showed amylase production in the medium containing corn starch and 16 in the medium containing babassu flour. Amylolytic bacteria have the potential to be used in starch degradation for biotechnological purposes. More studies are needed to select the best ones for this

purpose, such as the effect of pH, temperature, and the efficiency of converting corn starch and babassu flour into products with desirable biotechnological characteristics.

Keywords: Amylases; Microbial metabolism; Amazonian microbiota; Enzymatic activity.

Resumen

Evaluar la presencia de amilasas en rizobacterias es muy importante, ya que el almidón puede ser utilizado como materia prima para la elaboración de bioproductos de importancia económica. Se debe dar énfasis a aquellas que puedan utilizar el almidón de la harina de babasú, fortaleciendo la cadena productiva de esta palmera ignorada por la bioeconomía amazónica. Para ello, se ensayaron 40 rizobacterias en un medio de cultivo que contenía almidón de maíz o harina de babasú. Todos mostraron capacidad de crecer en los dos medios de cultivo, pero hubo una diferencia muy grande entre ellos, demostrada por los diámetros de sus colonias al quinto día de crecimiento. De las 40 rizobacterias, 19 mostraron producción de amilasa en el medio que contenía almidón de maíz y 16 en el medio que contenía harina de babasú. Las bacterias amilolíticas tienen el potencial de ser utilizadas en la degradación del almidón con fines biotecnológicos. Se necesitan más estudios para seleccionar los mejores para este propósito, como el efecto del pH, la temperatura y la eficiencia de convertir el almidón de maíz y la harina de babasú en productos con características biotecnológicas deseables.

Palabras clave: Amilasas; Metabolismo microbiano; Microbiota amazónica; Actividad enzimática.

1. Introdução

O babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) tem uma ocorrência generalizada na Amazônia e apesar de muito utilizado no Estado do Maranhão por milhares de famílias, havendo inclusive Associações e Cooperativas de mulheres maranhenses, as “quebradeiras de cocos”, vem sendo negligenciada no Norte brasileiro. Mesmo no Maranhão, seu aproveitamento não é considerado uma atividade prioritária entre as opções de trabalho produtivo das famílias de trabalhadores agroextrativistas, tanto por ser muito dispendiosa fisicamente, como também, pelo fato de sua exploração econômica ocorrer com baixíssima produtividade – pelo uso do machado e porrete de madeira em trilhas abertas na mata e pelo transporte do coco sobre o lombo de jumentos (Ayres Júnior, 2007).

Ainda segundo Ayres Júnior (2007), o babaçu sempre foi a alternativa econômica mais imediata que a família agroextrativista teve à disposição quando necessitava urgentemente adquirir víveres sem se endividar. Contudo, durante os últimos anos da década de 1970, e no decorrer da década seguinte, o preço do babaçu desvalorizou-se tanto, que eram necessários dez quilos de amêndoas para adquirir um único quilo de arroz. O resultado mais contundente desse fato, associado à crescente imposição de barreiras de acesso aos babaçuais pelos latifundiários, foi a redução na quantidade global de amêndoas ofertadas anualmente no mercado durante a década de 1980, o que afetou diretamente as indústrias de oleaginosas, reduzindo drasticamente as Unidades Produtivas de Óleo de Babaçu que existiam no Maranhão diminuindo de 112 em 1966, para apenas uma em 1996. Nesse período, o mercado internacional perdeu completamente a relevância, sendo substituído pelas indústrias nacionais, cujo capital que lhes deu corpo tinha origem no próprio capital comercial nacional e estadual, alguns dos quais decorrentes das atividades das Casas de Exportação. Em vista disso, devido às situações extrativistas e organizacionais das quebradeiras maranhenses, em 1996 esse Estado respondeu por 90,1% da produção de babaçu brasileira. O outro estado amazônico participante dessa produção, o Pará, respondeu por apenas 0,3% dessa produção. Os demais estados da região Norte nem constam dos dados divulgados pelo IBGE.

Apesar de haver estudos acadêmicos com espécies desse gênero visando o aproveitamento do fruto para a produção de etanol (Pavlak et al., 2007), seu uso restringe-se ao óleo e amêndoas, bem como na transformação do mesmo em carvão vegetal. O que pode mudar essa situação de uso restrito e regionalizado do babaçu é o aproveitamento econômico do seu mesocarpo na produção de álcool combustível e outros produtos biotecnológicos, fortalecendo a Cadeia Produtiva dessa palmeira, tendo em vista os teores elevados de amido nessa parte do fruto, que segundo Cruz et al. (2011), varia de 50-68,3 % de amido.

Desse modo, a obtenção de microrganismos contendo amilases, enzimas capazes de decompor o amido, tem uma importância econômica muito grande no fortalecimento da Cadeia Produtiva do babaçu. A elevada diversidade de microrganismos encontrada na natureza é um repositório rico para a obtenção de amilases que possam ser usadas nas bioindústrias (Abdulaal, 2018; Chapman et al., 2018; Bussa et al., 2019; Santos et al., 2020; Costa Junior et al., 2021).

Diversos estudos realizados com rizobactérias isoladas de solos amazônicos, mostraram que elas apresentam uma gama ampla de enzimas com potencial biotecnológico (Hara & Oliveira, 2004, 2005, 2007; Chagas Jr et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Brito et al., 2016; Oliveira & Oliveira, 2016; Minelli-Oliveira et al., 2019; 2020 a,b).

Alguns desses estudos mostraram também, a capacidade dessas bactérias em crescerem em condições ácidas (Hara & Oliveira, 2004, 2005, 2007; Chagas Jr et al., 2009; Menezes & Oliveira, 2016), qualidade essa essencial para poderem serem usadas agronomicamente nos latossolos e podzólicos ácidos da Amazônia (Oliveira, 1991), bem como em produzirem amilases (Oliveira et al., 2007 a,b, 2009, 2010; Oliveira & Oliveira, 2016; Cauper et al., 2017; Minelli-Oliveira et al., 2019; 2020 a,b), havendo também, publicações mostrando suas capacidades de crescerem em meio contendo farinha de babaçu (Costa et al., 2016).

Desse modo, torna-se necessário avançar nos estudos com essas rizobactérias, procurando-se selecionar as com maiores potenciais de decomposição do amido, principalmente o proveniente da farinha do babaçu, uma palmeira negligenciada na Amazônia, que pode servir de matéria prima para produtos biotecnológicos.

2 Metodologia

Foram escolhidas 40 rizobactérias (Tabela 1) pertencentes à coleção bacteriana do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia (LEBMAM), localizado no Campus III do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA.

Tabela 1. Culturas de rizobactérias selecionadas para as avaliações morfológica e fisiológica.

| Nº de registro da cultura | Local de coleta | Planta hospedeira |
|---------------------------|--|---|
| INPA_R001 | | |
| INPA_R012 | | |
| INPA_R014 | | |
| INPA_R015 | | |
| INPA_R028 | Novo Ayrão | Solo floresta |
| INPA_R034 | | |
| INPA_R046 | | |
| INPA_R178 | Brasileirinho | <i>Inga edulis</i> (Ingá) |
| INPA_R233 | | |
| INPA_R236 | | |
| INPA_R262 | Rio Preto da Eva | <i>Rhynchosia macrocarpum</i> |
| INPA_R266 | Rio Preto da Eva | <i>Inga</i> sp. (Ingá) |
| INPA_R268 | Rio Preto da Eva | <i>Inga</i> sp. (Ingá) |
| INPA_R269 | Rio Preto da Eva | <i>Mimosa pudica</i> |
| INPA_R276 | Rio Preto da Eva | <i>Inga edulis</i> (Ingá) |
| INPA_R285 | Rio Preto da Eva | trevinho |
| INPA_R287 | | |
| INPA_R288 | | |
| INPA_R292 | Rio Preto da Eva | <i>Inga edulis</i> (Ingá) |
| INPA_R296 | Rio Preto da Eva | <i>Inga</i> sp. (Ingá) |
| INPA_R297 | Rio Preto da Eva | <i>Mimosa pudica</i> |
| INPA_R298 | Rio Preto da Eva | <i>Mimosa pudica</i> |
| INPA_R318 | Rio Preto da Eva | <i>Indigofera</i> sp. |
| INPA_R325 | Rio Preto da Eva | |
| INPA_R548 | Ramal do Caldeirão, Km3 3°12'26" S W60°12'2,5" | S <i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo) |
| INPA_R689 | Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4" | <i>Inga edulis</i> (Ingá) |
| INPA_R721 | Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4" | <i>Inga edulis</i> (Ingá) |
| INPA_R722 | Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4" | <i>Inga edulis</i> (Ingá) |
| INPA_R739 | Manacapuru; Estrada do Acajatuba S 3°13'36,1" W 60°34'20,5" | <i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo) |
| INPA_R761 | Manacapuru; Estrada do Acajatuba S 3°13'36,1" W 60°34'20,5" | <i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo) |
| INPA_R781 | Balbina, Km 2 S 2°4'3,7" W 60°0'7,7" | <i>Desmodium triflorum</i> (Amor-do-campo) |
| INPA_R783 | Balbina, Km 2 S 2°4'3,7" W 60°0'7,7" | <i>Desmodium triflorum</i> (Amor-do-campo) |
| INPA_R792 | Balbina; Km 42 Sítio Marisa S 2°3'5,2" W 59°40'11,1" | <i>Inga edulis</i> (Ingá) |
| INPA_R961 | | |
| INPA_R976 | Itacoatiara; Novo Remanso S 03°38,8" W 058°58' 31,9" | <i>Inga edulis</i> (Ingá) |
| INPA_R1001 | | |
| INPA_R1060 | | |
| INPA_R1062 | Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4" | <i>Inga edulis</i> (Ingá) |
| INPA_R1065 | Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4" | <i>Inga edulis</i> (Ingá) |
| INPA_R1069 | Manacapuru; Ramal do Laranjal S 3°16'35,6" W 60°30'6,9" | <i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo) |

Fonte: Autores.

As rizobactérias foram reativadas em erlenmeyers contendo 50 mL de Yeast Mannitol Broth – YMB (Vincent, 1970) (10g de manitol, 0,5g de K₂HPO₄, 0,2g de MgSO₄, 0,1g de NaCl, 0,5g de extrato de levedura, 1000 mL de água destilada – pH 6,8). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (28°C), em agitação a 150 rpm, até o crescimento microbiano.

Após o crescimento microbiano, as rizobactérias foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultivo Yeast Manitol Ágar – YMA (YMB contendo 15 g de agar em 1000mL de meio), à temperatura ambiente (28°C). Estas condições também foram utilizadas para a manutenção das bactérias durante os experimentos.

A avaliação da capacidade de produção de amilase foi realizada em placas de Petri contendo os meios YMA modificado com farinha de babaçu e, YMA modificado com amido de milho como fontes de carbono para visualização do halo de degradação (região transparente ao redor das colônias). Com o auxílio de palitos de dentes esterilizados, foi retirada uma porção da colônia bacteriana, realizando-se um leve toque no meio de cultura; cada placa teve quatro colônias como repetições.

Os diâmetros das colônias bacterianas e dos halos de degradação foram medidos no quinto dia de crescimento utilizando-se um paquímetro digital. Para visualização dos halos e confirmação da atividade amilolítica, as placas foram submetidas ao iodo sublimado (vapores de iodo).

A partir dessas medidas, foram obtidos os Índices de Degradação do Amido (IDA) segundo os cálculos de Hankin & Anagnostakis (1975) e Berraquero et al. (1976) para cada isolado, pela fórmula:

$$IDA = \frac{DH}{DC}$$

Onde: DH = diâmetro da zona de degradação em mm

DC = diâmetro da colônia em mm

Para o planejamento, execução, coleta e análises dos dados foram usados os trabalhos de Koke (2011) e Pereira et al. (2018) como referências.

3. Resultados e Discussão

Todas as 40 cepas bacterianas foram capazes de crescer nos meios contendo amido de milho e amido de babaçu (farinha do mesocarpo); porém, somente 19 foram capazes de produzir amilase em meio contendo amido de milho (Tabela 2) e somente 15 produziram amilase no meio contendo amido de babaçu (Tabela 3).

Ao se usar o amido de milho (Tabela 2), observou-se que os diâmetros das colônias variaram de 3,22 mm (INPA R014) a 23,68 mm (INPA R285), enquanto os halos de degradação do amido variaram de 8,98 mm (INPA R292) a 26,18 mm (INPA236) entre as que apresentaram a presença visual da atividade amilolítica. Ao se analisar os Índices de Degradação do Amido (IDA), observa-se uma variação entre 1,04 mm (INPA R297) a 2,57 mm (INPA R233).

A presença visual do halo de degradação do amido é uma confirmação de que 19 das 40 rizobactérias produzem amilases, confirmando outras pesquisas com esse grupo de bactérias encontradas no sistema radicular de plantas amazônicas (Oliveira et al., 2006 a,b; 2007 a,b; 2009; 2010; Minelli-Oliveira et al., 2019; 2020)

Ao se comparar os resultados dos IDA do presente trabalho com os obtidos por Minelli-Oliveira et al. (2020), observa-se que foram semelhantes, uma vez que esses autores encontraram valores entre 1,3 e 2,8, confirmando essas características observadas em rizobactérias isoladas na Amazônia brasileira.

Um outro aspecto a ser considerado na Tabela 2 são os diâmetros das colônias das rizobactérias no meio de cultura com amido aos 5 dias de crescimento. As que apresentaram colônias com diâmetros maiores indicam maior facilidade e adaptação ao meio de cultura, sugerindo que numa possível escolha das melhores com relação ao IDA, deve-se levar em consideração também, as suas capacidades em crescerem nesse meio de cultura.

Por esse raciocínio, pode ser que seja vantajoso usar para fins biotecnológicos, as rizobactérias INPA R178, INPA R236, INPA R269, INPA R297, por exemplo, do que as INPA R046, INPA R233, INPA R287, INPA R296 e INPA R298, mesmo que essas apresentem maiores IDAs, pois seus crescimentos nesse meio de cultura foram bem menores do que os das primeiras citadas. No entanto, para se afirmar isso são necessários mais testes com essas rizobactérias.

Tabela 2. Índices de degradação de amido em meio contendo amido de milho obtidos com 5 dias de crescimento.

| Bactéria | Diâmetro (mm) | | |
|-------------------------|---------------|-----------|-------------|
| | Colônia (dc) | Halo (dh) | IDA (dh/dc) |
| INPA_R001 | 3,82 | 0 | 0,00 |
| INPA_R012 | 3,49 | 0 | 0,00 |
| INPA_R014 | 3,22 | 0 | 0,00 |
| INPA_R015 | 8,03 | 12,03 | 1,50 |
| INPA_R028 | 12,48 | 18,30 | 1,47 |
| INPA_R034 | 12,74 | 18,23 | 1,43 |
| INPA_R046 | 8,00 | 14,05 | 1,76 |
| INPA_R178 | 19,23 | 24,67 | 1,28 |
| INPA_R233 | 5,05 | 12,98 | 2,57 |
| INPA_R236 | 21,92 | 26,18 | 1,19 |
| INPA_R262 | 6,09 | 0 | 0,00 |
| INPA_R266 | 6,13 | 0 | 0,00 |
| INPA_R268 | 3,64 | 0 | 0,00 |
| INPA_R269 | 15,59 | 17,07 | 1,09 |
| INPA_R276 | 4,48 | 0 | 0,00 |
| INPA_R285 | 23,68 | 0 | 0,00 |
| INPA_R287 | 5,93 | 9,73 | 1,64 |
| INPA_R288 | 6,36 | 0 | 0,00 |
| INPA_R292 | 7,56 | 8,98 | 1,19 |
| INPA_R296 | 5,03 | 10,26 | 2,04 |
| INPA_R297 | 16,63 | 17,30 | 1,04 |
| INPA_R298 | 6,29 | 14,42 | 2,29 |
| INPA_R318 | 7,24 | 0 | 0,00 |
| INPA_R325 | 4,99 | 0 | 0,00 |
| INPA_R548 | 9,92 | 13,06 | 1,32 |
| INPA_R689 | 13,56 | 15,38 | 1,13 |
| INPA_R721 | 4,8 | 0 | 0,00 |
| INPA_R722 | 4,69 | 0 | 0,00 |
| INPA_R739 | 4,21 | 0 | 0,00 |
| INPA_R761 | 4,02 | 0 | 0,00 |
| INPA_R781 | 5,37 | 0 | 0,00 |
| INPA_R783 | 4,21 | 0 | 0,00 |
| INPA_R792 | 3,50 | 0 | 0,00 |
| INPA_R961 | 10,42 | 0 | 0,00 |
| INPA_R976 | 4,54 | 0 | 0,00 |
| INPA_R1001 | 14,58 | 15,47 | 1,06 |
| INPA_R1060 | 5,88 | 10,01 | 1,70 |
| INPA_R1062 | 7,56 | 12,88 | 1,70 |
| INPA_R1065 | 3,97 | 0 | 0,00 |
| INPA_R1069 | 14,50 | 23,83 | 1,64 |
| Médias gerais | 8,33 | 7,37 | 0,72 |
| Médias das amilolíticas | | 15,52 | 1,53 |

Fonte: Autores.

Ao se analisar o crescimento dessas rizobactérias e presença visual de atividade amilolítica no meio contendo farinha de babaçu (Tabela 3), observou-se de um modo geral, que nesse meio de cultura houve menos crescimento e manifestação da produção de amilase do que o contendo o amido de milho. A média de crescimento das colônias caiu de 8,33 mm para 5,61 mm; as médias dos halos de todas as bactérias e os das amilolíticas caíram respectivamente de 7,37 mm e 15,52 mm para 5,60 mm e 14,01 mm e, o número de amilolíticas caiu de 19 para 16 das 40 rizobactérias.

Somente os IDAs aumentaram, de 0,72 para 0,91 e, 1,53 para 2,28 respectivamente para as 40 bactérias e somente para as 16 amilolíticas. Esse aumento dos IDAs pode ser explicado pelo fato da redução dos diâmetros das colônias ter sido maior do que as dos diâmetros dos halos de degradação. Isso pode ser comprovado ao se comparar que a diferença dos diâmetros médios das colônias entre os dois meios foi de 2,72 mm, enquanto a diferença dos diâmetros médios dos halos entre os dois meios foi de 1,77 mm e 1,51 respectivamente para as 40 bactérias e para as 16 amilolíticas (Tabelas 2 e 3).

Tabela 3. Índices de degradação de amido em meio contendo farinha de babaçu obtidos com 5 dias de crescimento.

| Bactéria | Diâmetro (mm) | | |
|-----------|---------------|-----------|-------------|
| | Colônia (dc) | Halo (dh) | IDA (dh/dc) |
| INPA_R001 | 4,27 | 0 | 0 |
| INPA_R012 | 4,67 | 0 | 0 |
| INPA_R014 | 5,04 | 0 | 0 |
| INPA_R015 | 3,80 | 11,51 | 3,03 |
| INPA_R028 | 4,49 | 11,49 | 2,56 |
| INPA_R034 | 5,28 | 12,09 | 2,29 |
| INPA_R046 | 3,01 | 0 | 0 |
| INPA_R178 | 5,42 | 10,65 | 1,96 |
| INPA_R233 | 14,19 | 20,99 | 1,48 |
| INPA_R236 | 5,59 | 12,65 | 2,26 |
| INPA_R262 | 5,93 | 0 | 0 |
| INPA_R266 | 4,13 | 0 | 0 |
| INPA_R268 | 3,64 | 0 | 0 |
| INPA_R269 | 6,59 | 16,59 | 2,52 |
| INPA_R276 | 3,29 | 0 | 0 |
| INPA_R285 | 2,93 | 0 | 0 |
| INPA_R287 | 6,76 | 13,30 | 1,97 |
| INPA_R288 | 7,50 | 0 | 0 |
| INPA_R292 | 6,97 | 9,60 | 1,38 |
| INPA_R296 | 5,15 | 13,38 | 2,59 |
| INPA_R297 | 6,41 | 11,43 | 1,78 |
| INPA_R298 | 3,08 | 12,32 | 4,00 |
| INPA_R318 | 8,34 | 0 | 0 |
| INPA_R325 | 6,58 | 0 | 0 |
| INPA_R548 | 8,38 | 0 | 0 |
| INPA_R689 | 7,19 | 19,54 | 2,72 |
| INPA_R721 | 5,71 | 0 | 0 |
| INPA_R722 | 2,41 | 0 | 0 |
| INPA_R739 | 6,73 | 0 | 0 |
| INPA_R761 | 5,49 | 0 | 0 |
| INPA_R781 | 4,83 | 0 | 0 |

| | | | |
|-------------------------|-------|-------|------|
| INPA_R783 | 2,37 | 0 | 0 |
| INPA_R792 | 3,69 | 0 | 0 |
| INPA_R961 | 3,36 | 0 | 0 |
| INPA_R976 | 5,81 | 0 | 0 |
| INPA_R1001 | 3,63 | 0 | 0 |
| INPA_R1060 | 6,46 | 11,98 | 1,85 |
| INPA_R1062 | 5,68 | 0 | 0 |
| INPA_R1065 | 5,24 | 12,82 | 2,45 |
| INPA_R1069 | 14,50 | 23,83 | 1,64 |
| Médias gerais | 5,61 | 5,60 | 0,91 |
| Médias das amilolíticas | | 14,01 | 2,28 |

Fonte: Autores.

Quando se compara as médias das rizobactérias no meio com amido de milho (Tabela 2) com as obtidas no meio com farinha de babaçu (Tabela 3), observa-se que o diâmetro médio das colônias foi maior no meio com amido de milho (8,33 mm) do que no meio com farinha de babaçu (5,61 mm). O mesmo comportamento foi observado com a média dos diâmetros dos halos de degradação do amido, que foi de 7,37 mm comparado com 5,60 mm respectivamente nos dois meios. Ao se considerar apenas a média geral das rizobactérias que mostraram os halos de degradação de amido, também houve maior média no meio com amido de milho (15,52 mm, Tabela 2) do que no meio com farinha de babaçu (14,01 mm, Tabela 3).

Essas três médias maiores no meio com amido de milho indicam que essas rizobactérias têm maior facilidade de usar esse amido. No entanto, quando se compara as médias dos IDAs, verifica-se que foram maiores no meio contendo a farinha do mesocarpo do babaçu (Tabela 3), uma vez que nesse meio, os halos de degradação foram menos afetados negativamente do que no meio com amido de milho.

Esses dados confirmam outras publicações que documentaram a presença de amilase em rizobactérias da Amazônia (Oliveira et al., 2007 a,b, 2009, 2010; Oliveira & Oliveira, 2016; Cauper et al., 2017; Minelli-Oliveira et al., 2019; 2020 a,b), sendo mais um trabalho mostrando que elas possuem capacidade para crescerem em meio contendo farinha de babaçu (Costa et al., 2016).

Deve ser enfatizado que as amilases apresentam um amplo espectro de utilização nas indústrias, correspondendo a aproximadamente 25 % do mercado mundial de enzimas (Reddy et al., 2003; Souza & Magalhães, 2010), mostrando assim, a importância dessas rizobactérias amazônicas, devendo-se dar prioridade para as capazes de usar o amido da farinha do babaçu, pois podem contribuir para a incorporação dessa palmeira, que ocorre espontaneamente nas florestas amazônicas, na bioeconomia regional.

Com base nos dados desse trabalho, observa-se que nem todas as rizobactérias que degradam o amido do milho conseguem degradar o amido da farinha do babaçu, justificando estudos com o uso direto da farinha do babaçu com a finalidade de selecionar as com maiores potenciais para serem usadas em bioprocessos visando o aproveitamento da farinha dessa palmeira para fins biotecnológicos. Para isso, deve-se levar em conta, além do IDA, os diâmetros das colônias das rizobactérias no meio contendo a farinha do babaçu, pois essa característica indica uma maior velocidade de degradação dos constituintes contidos no meio de cultura. São necessários portanto, outros testes com as bactérias mais promissoras usadas nesse trabalho para indicar as melhores para essa finalidade.

4. Conclusões

Todas as 40 rizobactérias mostraram habilidade para crescerem nos dois meios de cultura, mas houve uma diferença muito grande entre elas, mostrada pelos diâmetros de suas colônias no quinto dia de crescimento.

Das 40 rizobactérias, 19 mostraram produção de amilase no meio contendo amido de milho e 16 no meio contendo farinha de babaçu, mostrando que possuem potencial para serem usadas na degradação do amido para fins biotecnológicos.

As 16 rizobactérias com amilases capazes de degradar o amido presente no mesocarpo do babaçu podem contribuir para a valorização da Cadeia Produtiva dessa palmeira, aumentando suas chances de ser incorporada na Bioeconomia da Amazônia.

São necessários mais estudos para selecionar as melhores para essa finalidade, tais como efeito do pH, temperatura e, a eficiência de conversão do amido do milho e da farinha do babaçu em produtos de características biotecnológicas desejáveis.

Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas), pelo apoio financeiro que permitiu realizar essa pesquisa.

Referências

- Abdulaal, W. H. (2018). Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. *BMC Biochemistry*, 19(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0094-8>
- Ayres Júnior, J. C. (2007). *A organização das quebradeiras de coco babaçu e a funcionalização de um espaço regional na Microrregião do Médio Mearim Maranhense*. Dissertação de mestrado em Desenvolvimento Regional e Urbano. Universidade Federal de Santa Catarina, 176p.
- Berraquero, F. R., Baya, A. M. & Cormenzana, A. R. (1976). Establishment of índices for the study of phosphate solubilization by soil bacteria. *Ars Pharmaceutica* 17:399-406.
- Brito, L. L., Menezes, N. C., Minelli-Oliveira, C. & Oliveira, L. A. (2016). *Biodegradação de petróleo por isolados de rizóbios provenientes de solos amazônicos*. In: Oliveira et al. (Eds.) *Diversidade Microbiana da Amazônia*. 1 ed. Manaus: Editora INPA, 2016, 1, 41-46.
- Bussa, N. F., Moges, M., Muthuswamy, M., & Abdisa, M. (2019). Isolation and Characterization of Amylase Enzyme from Selected Fungal Strains of Wof Washa Forest of. *Scientific Journal of Biology & Life Sciences*, 1(2), 1–10.
- Cauper, F. R.M., Brito, L. L., Minelli-Oliveira, C., Costa, S.S., Menezes, N. C. & Oliveira, L. A. (2017). *Potencial de produção de amilase por rizóbios isolados de nódulos de feijão caupi cultivado em solo da Amazônia* In: Oliveira et al. (Eds.) *Diversidade Microbiana da Amazônia*. 1 ed. Manaus: INPA, v.2, p. 107-114. 2017.
- Chagas Jr, A. F., Oliveira, L. A. & Oliveira, A.N. (2009). Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 39(2):467 – 470.
- Chapman, J., Ismail, A., & Dinu, C. (2018). Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- Costa, T. P., Menezes, N. C. & Oliveira, L. A. (2016). *Crescimento de rizobactérias em meio de cultura usando o mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) como fonte de carbono para fins biotecnológicos*. In: Oliveira et al. (Eds.) *Diversidade Microbiana da Amazônia*. 1 ed. Manaus: Editora INPA, v.1, p. 69-74.
- Costa Junior, J. A., Rosa, G. M., Wastowski, A. D., Soriani, H. H., Locatelli, A. P. C., Silva, D. W., Gonçalves, D. B., Volpi, G. B., Konzen, I. S., Flach, K. A., & Bones, U. A. (2021). Biotechnology: identification and evaluation of the *Bacillus cereus* amyolytic activity. *Research, Society and Development*, 10(13), e437101321301. 10.33448/rsd-v10i13.21301.
- Cruz, E. T. L. (2011). *Caracterização do Mesocarpo de Babaçu (*Orbignya sp*): Termoanálise (TG/DTA) e Avaliação do conteúdo de Amido*. Monografia do curso de Farmácia. Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- Hankin, L. & Anagnostakis, S.L. (1975) The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycology*, 67:597-607. <http://dx.doi.org/10.2307/3758395>
- Hara, F. A. S. & Oliveira, L. A. (2005). Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40:667 - 672.

- Hara, F. A. S. & Oliveira, L. A. (2004). Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo. Amazonas. *Acta Amazonica*, 34:343 - 357.
- Hara, F. A. S. & Oliveira, L. A. (2007). Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbio oriundos de solos ácidos do município do Rio Preto da Eva, Amazonas. *Revista de Ciências Agrárias* (Belém), 48:55 - 70.
- Köche, J. C. (2011). Fundamentos de Metodologia Científica. Teoria da ciência e iniciação à pesquisa. Editora Vozes, Petrópolis, 185p. <https://btux.com.br/wp-content/uploads/sites/10/2018/07/K%C3%B6che-Jos%C3%A9-Carlos-Da-Fundamentos-de-metodologia-cient%C3%ADfica--teoria-da-Atividade-e-inicia%C3%A7%C3%A3o-%C3%A0-pesquisa.pdf>
- Menezes, N. C. & Oliveira, L. A. (2016). Tolerância de rizóbios à acidez e ao alumínio In: Oliveira et al. (Eds.) Diversidade Microbiana da Amazônia. 1 ed. Manaus: Editora INPA, 1, 156-161.
- Minelli-Oliveira, C., Miyamoto, M. S. F., Astolfi Filho, S., Oliveira, L. A., & Pereira, J. O. (2019). Characterization of A-Amylases complex produced by a *Bradyrhizobium* sp. isolated from an Amazonian soil. *International Journal of Development Research*, 09:32868 - 32871, 2019.
- Minelli-Oliveira, C., Miyamoto, M. S. F., Astolfi Filho, S., Oliveira, L. A. & Pereira, J. O. (2020a). Effect of temperature and pH on amyolytic activities of *Bacillus atrophaeus* and *Paenibacillus polymyxa* isolated from Amazonian soils. *International Journal of Development Research*, 10(01):33249 - 33251.
- Minelli-Oliveira, C., Miyamoto, M. S. F., Astolfi Filho, S., Oliveira, L. A. & Pereira, J. O. (2020b). Presence of a-amylases in rhizobacteria isolated from Amazonian soils. *International Journal of Development Research*, 10:32252-32255.
- Oliveira, A. N., Flor, N. S. & Oliveira, L. A. (2010). Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Amazonica*, 40:401 - 404.
- Oliveira, F. R. & Oliveira, L. A. (2016). *Micro-organismos de solos amazônicos com habilidade em degradar gasolina obtida da Refinaria de Manaus* (REMAN). In: Oliveira et al. (Eds.) Diversidade Microbiana da Amazônia. Editora INPA, 1, 185-191.
- Oliveira, A.N., Oliveira, L. A. & Andrade, J. S. (2010). Partial characterization of amylases of two indigenous Central Amazonian rhizobia strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology* (Impresso), 53:35-45.
- Oliveira, A.N., Oliveira, L. A., Andrade, J. S. & Chagas Jr, A. F. (2007 a). Production of amylase by rhizobia using peach palm flour as substrate. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27:61-66.
- Oliveira, A.N., Oliveira, L. A., Andrade, J. S. & Chagas Jr, A. F. (2007 b). Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:208-216.
- Oliveira, A. N., Oliveira, L. A., Andrade, J. S. & Chagas Jr, A. F. (2006 a). Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ciência Tecnologia Alimentos*, 26:204-210.
- Oliveira, A. N., Oliveira, L. A., Andrade, J. S. & Chagas Jr, A. F. (2006 b). Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26:853-860.
- Pavlak, M. C. M., Zuniga, A. D., Lima, T. L. A., Arévalo-Pinedo, A., Carreiro, S. C., Fleury, C. S., & Silva, D. L. (2007). Aproveitamento da farinha do mesocarpo do babaçu (*Orbignya martiana*) para obtenção de etanol. *Evidência*, Joaçaba, 7(1):7-24.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J. & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. UFSM. https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.
- Reddy, N. S., Nimmagadda, A. & Sambasiva Rao, K. R. S. (2003). An overview of the microbial -amylase family. *Afr. J. Biotechnol.* 2, 645- 648.
- Santos, I. R., Mendes, T. P. S., Miranda, A. C. dos A., Costa, D. N., Figueroa, G. M., Soares, V. D. M., Valasques Junior, G. L., Cedro, P. & Évelin P. (2020). Production and characterization of amylase obtained from *Rhizopus microsporus* var. oligosporus. *Research, Society and Development*, 9(7): e694974810, 2020. 10.33448/rsd-v9i7.4810.
- Souza, P. M. & Magalhães, P. O. (2010). Application on microbial a-amylase in industry – a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:850-861.
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scient. (IBP Handbook, n. 15). 1970.