FLÁVIO AUGUSTO CARDOZO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUITINOLÍTICA POR
BACTÉRIAS DO GÊNERO *Aeromonas* ISOLADAS DO
ECOSSISTEMA MARINHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2012

FLÁVIO AUGUSTO CARDOZO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUITINOLÍTICA POR
BACTÉRIAS DO GÊNERO *Aeromonas* ISOLADAS DO
ECOSSISTEMA MARINHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Cardozo, Flávio Augusto.

Avaliação da atividade quitinolítica por bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas do ecossistema marinho / Flávio Augusto Cardozo. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Quitinases bacterianas.

Versão do título para o inglês: Chitinolytic activity evaluation by *Aeromonas* genus strains isolated from the marine ecosystem.

1. *Aeromonas* 2. Quitina 3. Quitinases 4. Bactérias Quitinolíticas
5. Ecossistema Marinho I. Rivera, Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez
II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan.
Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB0126/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Flávio Augusto Cardozo.

Título da Dissertação: Avaliação da atividade quitinolítica por bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas do ecossistema marinho.

Orientador(a): Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 438/11 referente ao projeto intitulado: *"Quitinases e determinação das condições de cultivo de bactérias quitinolíticas"* sob a responsabilidade de Flávio Augusto Cardozo, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico à minha família

*Por todo apoio, incentivo, carinho
e alegria que transmitiram
em toda minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família por toda força concedida para superar os obstáculos presentes em meu trajeto e por estarem sempre presentes em minha vida proporcionando momentos de reflexão, carinho e felicidade para que eu nunca desistisse e desanimasse.

À professora Irma Rivera pela confiança, orientação, incentivo e amizade nesses anos. A oportunidade de ser um integrante de sua equipe, sua ajuda em momentos importantes e seus ensinamentos possibilitou que eu realizasse uma conquista pessoal muito importante em minha vida.

À Claudiana pela sua amizade, humildade, simplicidade e alegria. Muito obrigado por sua ajuda, pelas conversas, dicas, incentivos e ensinamentos que possibilitaram que eu conquistasse meus objetivos.

À Lígia pela sua amizade e momentos de alegria e descontração durante esses anos no laboratório.

À Bianca, Nadia, Maicon, Cláudia, Gabriel, Vanessa, Thiago, Zita e Sr. Luis. Alunos, ex-alunos e técnicos de nossa equipe que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse estudo.

À Daniela Lício e Tais Kuniyoshi pelos ensinamentos, ajuda e acompanhamento em duas metodologias importantes desse estudo.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. José Gregório Cabrera, Dr. Bronislaw Polakiewicz e Dra. Elisabete Vicente pelas importantes sugestões.

Aos funcionários Fábria, Eliane e Marcos da secretaria de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia pela atenção e suporte fornecido nos momentos que precisei.

Aos amigos fora do círculo acadêmico que proporcionaram momentos felizes e que ajudaram a superar um pouco da distância da família.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

CARDOZO, F.A. **Avaliação da atividade quitinolítica por bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas do ecossistema marinho.** 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Bactérias quitinolíticas são autóctones e extremamente importantes no ecossistema marinho, pois desenvolvem um papel fundamental no ciclo de nutrientes através da degradação da quitina na coluna d'água. A hidrólise da quitina é realizada por enzimas denominadas quitinases, as quais possuem diversas funções na natureza. Diferentes quitinases bacterianas, tais como endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases têm sido descritas na literatura. Estas enzimas possuem diferentes mecanismos de hidrólise e podem ser utilizadas com diversos fins biotecnológicos. Com base na grande importância das bactérias quitinolíticas no ecossistema marinho e à procura de bactérias capazes de produzir quitinases para aplicação em processos biotecnológicos, o presente estudo teve como objetivo selecionar as melhores condições para o cultivo de 12 bactérias selecionadas do gênero *Aeromonas* a partir de três variáveis (temperatura, concentração de quitina e pH), avaliar o comportamento desses isolados na degradação de quitina durante 96 horas nas condições de cultivo pré-determinadas através de três metodologias (medida do halo de hidrólise de quitina, cromatografia líquida de alta eficiência e o teste de Antrona) e pela atividade de três enzimas quitinolíticas (*N*-acetil-glicosaminidase, quitobiosidase e endoquitinase). Além disso, caracterizá-las através do sequenciamento total do gene 16S rRNA e por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) utilizando três *housekeeping* genes (*recA*, *rpoB* e *rpoD*). Observou-se que os isolados podem representar duas espécies do gênero *Aeromonas* pelo sequenciamento dos *housekeeping* genes utilizados e que identificações baseadas no gene 16S rRNA não são apropriadas para a caracterização desses isolados em nível de espécie. Os isolados comportaram-se de diferentes maneiras em relação às condições de cultivo avaliadas e não necessariamente aqueles que apresentaram maior crescimento nas condições selecionadas foram aqueles que apresentaram maior atividade quitinolítica. O estudo mostrou que as bactérias atuaram na degradação de quitina durante as 96 horas de cultivo, mas que cada isolado possui sua particularidade, seja na tolerância às condições de cultivo, na degradação de quitina ou nos níveis e diversidade de quitinases. No entanto, observou-se que as quantificações dos produtos de hidrólise de quitina por cromatografia líquida de alta eficiência e dos açúcares solúveis totais não são apropriadas para avaliação da degradação de quitina, pois não permitem o monitoramento desse processo devido à insolubilidade da quitina.

Palavras-chave: *Aeromonas*. Quitina. Quitinase. Bactérias Quitinolíticas. Ecossistema Marinho.

ABSTRACT

CARDOZO, F. A. **Chitinolytic activity evaluation by *Aeromonas* genus strains isolated from the marine ecosystem**. 2012. 111 f. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Chitinolytic bacteria are autochthonous and extremely important in the marine ecosystem. They have key role in nutrient cycling through the chitin degradation in the water column. The hydrolysis of chitin is performed by enzymes called chitinases, which have many functions in nature. Different bacterial chitinases, such as endochitinases, chitobiosidases and *N*-acetyl-glucosaminidases have been described in the literature. These enzymes have different mechanisms of hydrolysis and may be used for various biotechnological purposes. Based on the great importance of chitinolytic bacteria in the marine ecosystem and looking for bacterial chitinase to use in biotechnological processes, this study aimed to select the best conditions for the cultivation of 12 selected chitinolytic bacteria of the *Aeromonas* genus using three variables (temperature, chitin concentration and pH), to evaluate the behavior of these isolates on chitin degradation during 96 hours of cultivation under pre-determined conditions by three methods (halo of chitin hydrolysis, high-performance liquid chromatography and Antrona test) and by chitinolytic activity of three enzymes (*N*-acetyl-glucosaminidase, chitobiosidase and endochitinase). Moreover, characterize them by 16S rRNA gene full sequencing and Multilocus Sequence Analysis (MLSA) using three housekeeping genes (*recA*, *rpoB*, and *rpoD*). It was observed that the isolates may represent two species of the *Aeromonas* genus by housekeeping genes sequencing and that identifications based on 16S rRNA gene are not suitable for the characterization of these isolates to the species level. The isolates had different behavior in relation under conditions evaluated and not necessarily those with greatest growth under the conditions selected were those that showed higher chitinolytic activity. The study showed the bacteria acted about chitin degradation during the 96 hours of cultivation, but each isolate has own features, or tolerance to conditions of cultivation, on chitin degradation and levels or diversity of chitinases. However, it was observed that the measurements of chitin hydrolysis products by high-performance liquid chromatographic and soluble sugars are not suitable for evaluation of the chitin degradation, because it does not allow monitoring of the process due to the insolubility of chitin.

Keywords: *Aeromonas*. Chitin. Chitinase. Chitinolytic Bacteria. Marine Ecosystems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação estrutural da quitina	18
Figura 2 - Representação esquemática das três formas de quitina	19
Figura 3 - Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA, <i>recA</i> , <i>rpoB</i> e <i>rpoD</i>	34
Figura 4 - Metodologia aplicada para avaliação das condições de cultivo das bactérias quitinolíticas	36
Figura 5 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA das bactérias quitinolíticas	43
Figura 6 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene <i>recA</i> das bactérias quitinolíticas	44
Figura 7 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene <i>rpoB</i> das bactérias quitinolíticas	45
Figura 8 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene <i>rpoD</i> das bactérias quitinolíticas	46
Figura 9 - Cultivo de bactérias quitinolíticas em caldo mineral com quitina antes e após 96 horas	47
Figura 10 - Crescimento de bactérias quitinolíticas semeadas pelo método de espalhamento em superfície (<i>Spread plate</i>).....	47
Figura 11 - Crescimento máximo das bactérias quitinolíticas quando expostas às temperaturas de 28 e 37 °C, independentes do período de cultivo.....	48
Figura 12 - Crescimento máximo das bactérias quitinolíticas quando expostas a diferentes concentrações de quitina, independentes do período de cultivo.....	49
Figura 13 - Crescimento máximo das bactérias quitinolíticas cultivadas em meio mineral contendo 2,5% de quitina quando expostas a diferentes valores de pH.....	50
Figura 14 - Crescimento máximo das bactérias quitinolíticas cultivadas em meio mineral contendo 1,2% de quitina quando expostas a diferentes valores de pH.....	51
Figura 15 - Concentração máxima de bactérias quitinolíticas durante avaliação da degradação de quitina	52
Figura 16 - Halos de hidrólise de quitina produzidos por bactérias quitinolíticas.	53
Figura 17 - Diâmetros dos halos de hidrólise de quitina produzidos pelas bactérias quitinolíticas em ágar mineral contendo 1,2% de quitina	54

Figura 18 - Cromatogramas exibindo a concentração de <i>N</i> -acetil-glicosamina no cultivo do isolado CH129 de acordo ao tempo de incubação.....	55
Figura 19 - Concentrações de AST liberados no cultivo das bactérias quitinolíticas de acordo ao tempo de incubação	57
Figura 20 - Atividades de <i>N</i> -acetil-glicosaminidases das bactérias quitinolíticas de acordo ao tempo de incubação	58
Figura 21 - Atividades de quitobiosidases das bactérias quitinolíticas de acordo ao tempo de incubação	59
Figura 22 - Atividades de endoquitinases das bactérias quitinolíticas de acordo ao tempo de incubação	60
Figura 23 - Dendrogramas construídos com os perfis enzimáticos dos isolados obtidos através da técnica de SDS-PAGE de acordo ao tempo de incubação	61
Figura 24 - Dendrogramas construídos com os perfis enzimáticos dos isolados obtidos através da técnica de SDS-PAGE durante 96 horas de cultivo	62
Figura 25 - Perfil enzimático do isolado CH101 de acordo ao tempo de incubação	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos isolados incluídos no estudo por tipo de amostra e origem de isolamento.....	31
Tabela 2 - Resumo das condições selecionadas para o cultivo de cada bactéria quitinolítica	51
Tabela 3 - Variação do pH no cultivo de bactérias quitinolíticas de acordo ao tempo de incubação.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Quitina	18
2.2 Quitinases	20
2.3 Aplicações biotecnológicas da quitina e quitinases.....	22
2.4 Bactérias quitinolíticas no ecossistema marinho	24
2.5 Caracterização da atividade quitinolítica bacteriana	26
2.6 Condições de cultivo de bactérias quitinolíticas	27
2.7 Caracterização molecular do gênero <i>Aeromonas</i>	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Seleção de bactérias quitinolíticas.....	31
4.2 Reisolamento de bactérias quitinolíticas	31
4.3 Caracterização molecular pelo sequenciamento de genes	32
4.3.1 Extração de DNA genômico	32
4.3.2 Amplificação de genes utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)	32
4.3.2.1 Gene 16S rRNA.....	32
4.3.2.2 Gene <i>recA</i>	32
4.3.2.3 Gene <i>rpoB</i>	33
4.3.2.4 Gene <i>rpoD</i>	33
4.3.3 Visualização dos fragmentos amplificados de DNA.....	34
4.3.4 Purificação e sequenciamento dos fragmentos amplificados	34
4.4 Avaliação das condições de cultivo	34
4.4.1 Preparação do inóculo para uso nos ensaios	35
4.4.2 Avaliação do crescimento bacteriano	35
4.4.3 Avaliação da variável temperatura no cultivo de bactérias quitinolíticas	35
4.4.4 Avaliação da variável concentração de quitina no cultivo de bactérias quitinolíticas ..	35
4.4.5 Avaliação da variável pH no cultivo de bactérias quitinolíticas	35
4.5 Avaliação da degradação de quitina por bactérias quitinolíticas	36

4.5.1 Preparação das amostras do cultivo de bactérias quitinolíticas para avaliar a degradação da quitina.....	37
4.5.2 Avaliação da degradação de quitina.....	37
4.5.4.1 Avaliação da degradação de quitina em meio sólido	37
4.5.4.2 Avaliação da degradação de quitina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	38
4.5.4.3 Avaliação da degradação de quitina pela quantificação de açúcares solúveis totais (AST).....	38
4.5.5 Avaliação da atividade de enzimas quitinolíticas	39
4.6 Avaliação do perfil enzimático de bactérias quitinolíticas	39
4.6.1 Preparação das amostras.....	39
4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	39
4.7 Análise dos resultados	40
4.7.1 Avaliação das condições de cultivo.....	40
4.7.2 Análise das sequências obtidas pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, recA, rpoB e rpoD.....	41
4.7.3 Análise dos perfis enzimáticos de bactérias quitinolíticas.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Caracterização molecular pelo sequenciamento de genes	42
5.1.1 Gene 16S rRNA.....	42
5.1.2 Gene recA	43
5.1.3 Gene rpoB.....	44
5.1.4 gene rpoD	45
5.2 Avaliação das condições de cultivo	47
5.2.1 Cultivo e contagem de bactérias quitinolíticas	47
5.2.2 Avaliação das variáveis selecionadas	48
5.3 Avaliação da degradação de quitina por bactérias quitinolíticas	51
5.3.1 Determinação da concentração bacteriana	51
5.3.2 Avaliação do pH.....	52
5.3.3 Avaliação da degradação de quitina em meio sólido	53
5.3.4 Avaliação da degradação de quitina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	54
5.3.5 Avaliação da degradação de quitina pela quantificação de açúcares solúveis totais (AST).....	56

5.3.6 Avaliação da atividade de enzimas quitinolíticas	57
5.4 Avaliação do perfil enzimático de bactérias quitinolíticas	60
5.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	60
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	64
6.1 Caracterização molecular de bactérias quitinolíticas pertencentes ao gênero <i>Aeromonas</i>	64
6.2 Determinação das condições de cultivo para avaliação da degradação de quitina por bactérias quitinolíticas do gênero <i>Aeromonas</i>	65
6.2.1 Metodologia de cultivo e contagem de bactérias quitinolíticas	65
6.2.2 Avaliação das variáveis selecionadas	66
6.3 Avaliação da degradação de quitina por bactérias quitinolíticas do gênero <i>Aeromonas</i>	69
6.3.1 Avaliação da degradação de quitina	69
6.3.2 Avaliação da atividade de enzimas quitinolíticas	71
6.3.3 Avaliação do pH	72
6.3.4 Avaliação do crescimento bacteriano	74
6.4 Avaliação do perfil enzimático de bactérias quitinolíticas	75
7 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICES	94
APÊNDICE A - Avaliação das condições de cultivo: Contagem de bactérias quitinolíticas de acordo à temperatura e período de incubação	95
APÊNDICE B – Avaliação das condições de cultivo: Representação gráfica do crescimento de acordo à temperatura e período de incubação para cada bactéria quitinolítica	96
APÊNDICE C - Avaliação das condições de cultivo: Contagem de bactérias quitinolíticas de acordo à concentração de quitina e período de incubação	98
APÊNDICE D - Avaliação das condições de cultivo: Representação gráfica do crescimento de acordo à concentração de quitina e período de incubação para cada bactéria quitinolítica	99
APÊNDICE E - Avaliação das condições de cultivo: Contagem de bactérias quitinolíticas de acordo ao pH e período de incubação	101
APÊNDICE F - Avaliação das condições de cultivo: Representação gráfica do crescimento de acordo ao pH e período de incubação para cada bactéria quitinolítica, em meio de cultura contendo 2,5% de quitina	102

APÊNDICE G - Avaliação das condições de cultivo: Representação gráfica do crescimento de acordo ao pH e período de incubação para cada bactéria quitinolítica em meio de cultura contendo 1,2% de quitina	104
APÊNDICE H - Avaliação da degradação de quitina: Contagem de bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação nas condições de cultivo pré-determinadas	105
APÊNDICE I - Avaliação da degradação de quitina: Medida dos halos de hidrólise produzidos por cada bactéria quitinolítica em ágar mineral contendo 1,2% de quitina, pH 7,0, após 96 horas de incubação a 28 °C	106
APÊNDICE J - Avaliação da degradação de quitina: Concentrações de <i>N</i> -acetil-glicosamina, quitobiose e quitotriose liberadas pelas bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação e às condições de cultivo pré-determinadas	107
APÊNDICE K - Avaliação da degradação de quitina: Concentrações de açúcares solúveis totais (AST) liberadas pelas bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação e às condições de cultivo pré-determinadas.....	108
APÊNDICE L - Avaliação da degradação de quitina: Atividade de <i>N</i> -acetil-glicosaminidases pelas bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação e às condições de cultivo pré-determinadas.....	109
APÊNDICE M - Avaliação da degradação de quitina: Atividade de quitobiosidases pelas bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação e às condições de cultivo pré-determinadas.....	110
APÊNDICE N - Avaliação da degradação de quitina: Atividade de endoquitinases pelas bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação e às condições de cultivo pré-determinadas.....	111

1 INTRODUÇÃO

As bactérias quitinolíticas são extremamente importantes no ecossistema marinho, pois possibilitam a restauração dos níveis de carbono e nitrogênio através da degradação da quitina na coluna d'água. As bactérias envolvidas nesse processo mostram-se altamente eficientes, já que apenas vestígios de carapaças de artrópodes e outros organismos que possuem quitina em sua estrutura são encontrados nos sedimentos oceânicos. No entanto, a atividade antropogênica tem atingido níveis agressivos nos últimos anos, podendo afetar de maneira negativa ou positiva a sobrevivência dessas bactérias, ou seja, essas bactérias podem ser eliminadas de seus habitats em um curto período de tempo ou adquirir resistência às pressões seletivas do ambiente tornando-se capazes de realizar de maneira cada vez mais eficiente suas funções.

Diante da importância das bactérias quitinolíticas para a manutenção da vida no ecossistema marinho, da ausência de trabalhos científicos sobre a diversidade dessas bactérias no litoral brasileiro, e ainda, buscando selecionar espécies bacterianas com capacidade de produzir quitinases em níveis que pudessem ser empregados em processos biotecnológicos, iniciou-se em 2005 no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, um trabalho sobre a diversidade de bactérias quitinolíticas no litoral do Estado de São Paulo. Através desse trabalho realizado por Souza (2009), onde foram coletadas amostras de água do mar e plâncton no Canal de São Sebastião, Ubatuba e Baixada Santista, foi possível conhecer a diversidade de bactérias quitinolíticas em ambientes naturais com diferentes níveis de atividade antropogênica, obter um total de 492 bactérias quitinolíticas e ainda selecionar aquelas que apresentavam maior capacidade de degradação de quitina.

As 492 bactérias quitinolíticas obtidas foram analisadas quanto a sua capacidade de degradação de quitina em meio mineral contendo quitina como única fonte de carbono após 96 horas de incubação a 28 °C. A capacidade de degradação de quitina foi verificada a partir da medida do diâmetro dos halos de hidrólise formados ao redor das colônias, as quais indicavam o potencial de produção de quitinases pelas bactérias quitinolíticas.

Diante dos trabalhos realizados pelo grupo do nosso laboratório com bactérias quitinolíticas desde 2005, de todo o conhecimento adquirido durante esses anos e do crescente interesse biotecnológico por quitinases e bactérias quitinolíticas, 12 bactérias quitinolíticas do gênero *Aeromonas* parcialmente sequenciadas pelo gene 16S rRNA e com maior capacidade de degradação de quitina (SOUZA, 2009) foram selecionadas para o presente projeto de

mestrado, visando selecionar as melhores condições de cultivo a partir de três variáveis selecionadas (temperatura, concentração de quitina e pH) e avaliar o comportamento desses isolados na degradação de quitina durante 96 horas de cultivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Quitina

A quitina é um polissacarídeo insolúvel de estrutura cristalina formado por cadeias não ramificadas de *N*-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (Figura 1) (HACKMAN; GOLDBERG, 1965). É o principal constituinte do exoesqueleto dos artrópodes e da parede celular dos fungos e algas e pode ser encontrada associada a lipídeos, proteínas, pigmentos e açúcares. Superada apenas pela celulose, a quitina é a segunda substância orgânica encontrada em maior quantidade na natureza e a mais abundante no ambiente marinho (GOODAY, 1990).

Figura 1 - Representação estrutural da quitina

FONTE: DELEZUK, 2009.

Em função do organismo e do papel desempenhado, a quitina pode ser encontrada na natureza em três estruturas polimórficas distintas denominadas alfa-quitina (α -quitina), beta-quitina (β -quitina) e gama-quitina (γ -quitina) (Figura 2) (HACKMAN; GOLDBERG, 1965; RUDALL; KENCHING, 1973). A forma mais comum existente na natureza é a α -quitina, a qual é constituída por cadeias organizadas de forma antiparalela (CARLSTROM, 1957). Ela ocorre fortemente associada a proteínas, materiais inorgânicos e está presente em estruturas rígidas e resistentes como a cutícula de artrópodes (RUDALL; KENCHING, 1973). A β -quitina pode ser encontrada em espinhos e cerdas de alguns anelídeos, em tubos de poliquetos, na concha interna de lulas, na carapaça de algumas diatomáceas (BLACKWELL et al., 1967; BLACKWELL; WEIH, 1984; HERTH et al., 1986) e é constituída por cadeias organizadas de forma paralela, o que possibilita a formação de ligações intermoleculares mais fracas e uma menor estabilidade dessa molécula em comparação a α -quitina (KURITA, 2001). Já a γ -quitina, é a forma mais rara presente na natureza e é constituída por uma mistura de α e β -quitina, ou seja, duas de três cadeias são organizadas de forma paralela e a terceira aparece na direção oposta. (RUDALL; KENCHING, 1973). Essa forma de quitina pode ser

encontrada em casulos de dois gêneros de besouros e no revestimento do estômago de lulas (MUZZARELLI, 1977).

Figura 2 - Representação esquemática das três formas de quitina

FONTE: EINBU, 2007.

A quitina pode ser obtida a partir de uma variedade de organismos marinhos, insetos e fungos, mas as principais matérias-primas para produção industrial de quitina são as carapaças de crustáceos originadas do processamento industrial de frutos do mar (ABRAM; HIGUERA, 2004; ROBERTS, 1992). O Japão, os EUA e a China são os responsáveis pela maior produção de quitina em nível mundial, mas esse polímero também é produzido em menores escalas na Índia, Noruega, Canadá, Itália, Polônia, Chile e Brasil (ABRAM; HIGUERA, 2004).

A extração de quitina a partir da biomassa envolve a execução de tratamentos químicos sequenciais destinados a eliminar as substâncias que a acompanham. Nos crustáceos, a quitina encontra-se firmemente associada aos demais constituintes do exoesqueleto. Portanto, três etapas são requeridas para isolar esse polissacarídeo: desproteínização, desmineralização e despigmentação (ABRAM; HIGUERA, 2004; ROBERTS, 1992).

A eliminação das proteínas pode ser realizada utilizando um grande número de solventes, sendo o NaOH o mais utilizado. A desmineralização pode ser obtida realizando um tratamento com diferentes tipos de ácidos, como HCl, HNO₃ e H₂SO₃, sendo o HCl, geralmente, o ácido mais utilizado para essa etapa (ANTONINO, 2007). Os exoesqueletos de crustáceos contêm pigmentos que não parecem estar complexados com materiais inorgânicos ou proteínas, pois não são eliminados durante a desproteínização e desmineralização. Esses pigmentos podem ser eliminados pela extração com etanol ou acetona, depois do tratamento de desmineralização ou por branqueamento com uso de KMnO₄, NaClO, SO₂, NaHSO₃,

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ou H_2O_2 (ANTONINO, 2007).

2.2 Quitinases

As quitinases constituem um importante grupo de enzimas associadas à hidrólise de quitina e possuem diversas funções na natureza como associação aos mecanismos de defesa, nutrição e morfogênese numa ampla diversidade de organismos (KEYHANI; ROSEMAN, 1999; SUGINTA et al., 2009). As bactérias quitinolíticas empregam as quitinases no processo de hidrólise de quitina, o que permite sua reciclagem na natureza (SVITIL et al., 1997; WANG et al., 1997; ZOBELL; RITTENBERG, 1938). Nos artrópodes, elas estão envolvidas nas etapas de crescimento denominado ecdise, atuando na quebra das moléculas de quitina que unem o exoesqueleto aos músculos possibilitando que estes organismos liberem essa carapaça “apertada” e forme uma nova (MERZENDORFER; ZIMMICH, 2003). Nas plantas, estão envolvidas nos mecanismos de resistência a fungos, insetos e outros fitopatógenos, evitando assim o surgimento de doenças (AJIT et al., 2006; TANAKA et al., 1970; ZHANG et al., 2001). Nos fungos, as quitinases são utilizadas nos processos nutricionais, autolíticos e morfogenéticos (ADAMS, 2004) e no caso de alguns tipos de vírus, como por exemplo, os baculovírus, as quitinases ajudam na penetração da membrana peritrófica dos insetos e na liberação dos vírus após a morte do inseto hospedeiro (GOODAY, 1995). Já em mamíferos, incluindo os humanos, quitinases têm sido encontradas em macrófagos, acreditando-se que estejam envolvidas nos mecanismos de defesa contra agentes patogênicos (TJOELKER et al., 2000; BOOT et al., 2001), uma vez que níveis elevados de quitinases foram encontrados tanto no sangue como em tecidos de cobaias infectadas por *Aspergillus fumigatus* (OVERDIJK et al., 1996; OVERDIJK et al., 1999).

As quitinases são enzimas responsáveis pela despolimerização da quitina. Elas hidrolisam as ligações glicosídicas entre as unidades de açúcares e estão classificadas no grupo das glicosil-hidrolases. As glicosil-hidrolases são classificadas através do banco de dados enzimáticos CAZy (Carbohydrate-Active EnZYmes) (CANTAREL et al., 2009; DAVIES; HERISSAT, 1995; HENRISSAT; BAIROCH, 1996), o qual fornece uma lista continuamente atualizada das famílias de glicosil-hidrolases e, que há alguns anos, também fornece uma lista de outras famílias de enzimas que atuam sobre carboidratos, tais como polissacarídeo-liases (PLs), glicosil-transferases (GTs) e carboidrato-esterases (CEs) (CANTAREL et al., 2009).

De acordo com o sistema de classificação das glicosil-hidrolases, as quitinases estão

agrupadas dentro das famílias 18 e 19 e podem ser encontradas em bactérias, fungos, leveduras, vírus, plantas e animais (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT; BAIROCH, 1993; OHNO et al., 1996; SUZUKI et al., 1999; KARLSSON; STENLID, 2009). Essas enzimas têm a exclusiva capacidade de hidrolisar ligações glicosídicas β -1,4 entre as unidades de *N*-acetil-D-glicosamina (FUKAMIZO et al., 1994; MASSON et al., 1994) e podem ser classificadas em duas grandes categorias baseando-se na forma com que atuam na despolimerização da quitina: as exoquitinases e endoquitinases. As exoquitinases podem ser divididas em duas subcategorias, as quitobiosidases e β -*N*-acetil-glicosaminidases (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998; DEANE et al., 1998; NOMENCLATURE COMMITTEE OF INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 1992). As endoquitinases clivam aleatoriamente a molécula de quitina liberando oligossacarídeos como quitotetrose, quitotriose e quitobiose. As quitobiosidases liberam somente diacetilquitobioses (dímeros de *N*-acetil-glicosamina), já as β -*N*-acetil-glicosaminidases clivam os oligossacarídeos produzidos pelas endoquitinases e quitobiosidades, gerando monômeros de *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998; HARMAN et al., 1993; SAHAI; MANOCHA, 1993).

Outra classe de quitinases denominada quitina deacetilase (CE 3.5.1.41) foi descoberta a partir de extratos do fungo *Mucor rouxii* (ARAKI; ITO, 1975), a qual hidrolisa o grupo acetamido nas unidades de *N*-acetil-glicosamina da quitina gerando unidades de glicosamina e ácido acético. Ela é um dos membros da família 4 das carboidrato-esterases (CE-4s), tal como definido no banco de dados CAZy (COUTINHO; HENRISSAT, 1999) e após um crescente interesse nas suas funções, vários estudos detectaram sua presença em fungos (ARAKI; ITO, 1975), insetos (DIXIT et al., 2008) e bactérias (LI et al., 2007; ROSEMAN, 1957; ZHOU et al., 2010).

Varias outras enzimas quitinolíticas têm sido descritas na literatura, cada uma com sua função específica. Li e colaboradores (2007), por exemplo, caracterizaram uma oligossacarídeo deacetilase em *Vibrio cholerae*. Segundo os autores, essa enzima é muito ativa com oligossacarídeos de quitina, mas praticamente inativa com GlcNAc. Já Scigelova e Crout (1999) descreveram o potencial de uma β -*N*-acetil-hexosaminidase em hidrolisar a quitina.

Um grande número de enzimas com capacidade de hidrolisar a quitina tem sido descrito na literatura (BASSLER et al., 1991; HOWARD et al., 2003; KEYHANI; ROSEMAN, 1996b; KEYHANI; ROSEMAN, 1999; LAN et al., 2004; MUHAMMAD et al., 2010). No entanto, endoquitinases, quitobiosidases e β -*N*-acetil-glicosaminidases são aquelas

nas quais a forma de atuação na hidrólise da quitina estão melhor caracterizadas (DAHIYA et al., 2006; SAHAI; MANOCHA, 1993).

2.3 Aplicações biotecnológicas da quitina e quitinases

A quitina foi descoberta em 1811, pelo cientista francês Henri Braconnot, mas a falta de conhecimento básico sobre suas propriedades, incluindo a reatividade química, limitou severamente suas aplicações industriais até o início de 1970 (ROBERTS, 1992). A partir de então, o interesse progressivo na química da quitina resultou no desenvolvimento de muitos estudos que visaram aumentar o conhecimento sobre as estruturas e propriedades deste polímero e seus derivados: quitosana, quitoooligossacarídeos e *N*-Acetil-glicosamina (GlcNAc). Os derivados da quitina possuem características adequadas à sua aplicação em diversas áreas devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, capacidade de adsorção e formação de membranas, bioadesividade, atividade antimicrobiana, antitumoral, entre outras (SILVA et al., 2006).

A quitosana corresponde a uma forma desacetilada da quitina com capacidade de interagir com uma variada gama de substâncias, tais como proteínas, lipídeos, pesticidas, corantes, íons metálicos e radioisótopos (AGULLÓ et al., 2004; KOIDE, 1998; SENEL; MCCLURE, 2004; RINAUDO, 2006; ROBERTS, 1992). Esse derivado da quitina contém atividade antimicrobiana, é atóxico, biocompatível, biodegradável (ILLUM, 1998; MASS et al., 1998) e possui grande potencial para aplicações na agricultura, medicina, odontologia, formulações farmacêuticas e no tratamento de efluentes (ABRAM; HIGUERA, 2004; BOGUSLAWSKI et al., 1990; RINAUDO, 2006; ROBERTS, 1992).

Os quitoooligossacarídeos são homo ou heterooligômeros de *N*-acetil-glicosamina e glicosamina obtidos a partir da hidrólise da quitina. Estudos na área médica descrevem seu potencial contra asma (DONNELLY; BARNES, 2004; ZHU et al., 2004), como agentes antibacterianos (RHOADES et al., 2006), agentes cicatrizantes (RIBEIRO et al., 2009; YOU et al., 2004) e vetores em terapia genética (KOPING-HOGGARD et al., 2003; KOPING-HOGGARD et al., 2004). Além disso, de acordo com a literatura, quitoooligossacarídeos podem reduzir a metástase e o crescimento de tumores cancerígenos (MUZZARELLI, 1977; NAM et al., 2007; SHEN et al., 2009), aumentar a resistência óssea na osteoporose (KLOKKEVOLD et al., 1996; RATANAVARAPORN et al., 2009) e prevenir a malária através da inibição das quitinases do *Plasmodium* (SHAHABIDDIN et al., 1993). Outros potenciais benefícios dos quitoooligossacarídeos estão sendo descritos, incluindo efeitos

imunomoduladores (KIM et al., 2006), atividade antifúngica (OLIVEIRA et al., 2008) e diminuição dos níveis séricos de glicose em diabéticos (LEE et al., 2003).

Outro derivado da quitina é a *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc), uma unidade monomérica da quitina. Esse açúcar, também presente no corpo humano, é um componente do ácido hialurônico, de glicoproteínas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e outras estruturas do tecido conjuntivo (LEVIN et al., 1961) e pode ser encontrado até mesmo no leite materno humano (KOBATA; GINSBURG, 1969; MILLER et al., 1994). Estudos indicam que GlcNAc é um componente importante da síntese biomacromolecular no corpo humano (HEIM et al., 1989; SHOJI et al., 1999), é atóxico e não altera os níveis glicêmicos no sangue (LEVIN et al., 1961; LIU et al., 2008). GlcNAc mostra ser um valioso agente farmacológico no tratamento de uma ampla variedade de doenças, no tratamento de lesões articulares, doenças inflamatórias intestinais e pode ser usado como substrato na produção de ácido siálico e cosméticos (CHEN et al., 2010). Mais recentemente, GlcNAc tem sido descrita como uma via potencial para produção de bioetanol como alternativa a utilização de glicose como fonte de carbono por *Saccharomyces cerevisiae* mutante (ROSEMAN et al., 2010).

Devido as suas diferentes funções na natureza e as formas com que atuam na hidrólise da quitina, as quitinases têm sido alvo de muitos estudos para serem aplicadas em diversas áreas, principalmente na produção de derivados de quitina (NAKAKUKI, 1993).

Os métodos convencionais realizados para obtenção de quitosana, por exemplo, baseiam-se na hidrólise parcial da quitina em meio alcalino sob alta temperatura. Além de apresentarem baixos rendimentos, estes processos causam quebras aleatórias no polímero, produzindo oligômeros com tamanho e grau de desacetilação variados (MATHUR e NARANG, 1990). A utilização de quitina deacetilases na desacetilação e endoquitinases no controle do tamanho das cadeias pode ser uma alternativa mais adequada para a produção de quitosana com massa molar média e grau de desacetilação controlados, o que evitaria a formação de subprodutos indesejáveis e perdas durante os processos (KIM; RAJAPAKSE, 2005; TRUDEL e ASSELAIN, 1990).

A utilização de quitinases para produção enzimática de quitoooligossacarídeos e *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) tem despertado interesse nos últimos anos devido as funcionalidades desses derivados na medicina, como componentes de cosméticos e na produção de bioetanol. Esses derivados são tradicionalmente produzidos por métodos químicos. No entanto, esses procedimentos apresentam vários problemas na produção, não só devido à razões técnicas, como o custo elevado e o baixo rendimento (abaixo de 65%), mas também em relação às grandes quantidades de resíduos químicos resultantes dos processos

que podem afetar o meio ambiente (MORI et al., 2010). Dessa maneira, a utilização de quitinases para hidrólise enzimática da quitina pode ser uma alternativa à produção desses derivados.

Durante a produção industrial de quitoooligossacarídeos e GlcNAc, diferentes quitinases podem ser purificadas e utilizadas a partir da produção em massa de microrganismos selvagens ou geneticamente modificados (OPPENHEIM; CHET, 1992; PAN et al., 1996; ROBERTS; CABIB, 1982;). Vários procedimentos podem ser realizados para produção desses derivados. Sashiwa e colaboradores (2002), por exemplo, descrevem a produção eficaz de GlcNAc de α -quitina a partir do extrato enzimático bruto de *Aeromonas hydrophila* H2330 contendo endo e exoquitinases. Neste estudo, a produção de oligômeros de GlcNAc foi insignificante e o rendimento de aproximadamente 77% de GlcNAc foi obtido. Como maiores atividades de exoquitinases foram observadas nesse estudo, os autores sugerem que a ação conjunta de endoquitinases e exoquitinases, presentes no extrato enzimático bruto, possibilitam a produção seletiva de GlcNAc e que maiores níveis de exoquitinases e *N*-acetil-glicosaminidases geram maiores quantidades de GlcNAc.

Recentemente, quitinases estão sendo alvos de estudos para produção de bioetanol. Roseman e colaboradores (2010) realizaram esse estudo através de uma cadeia que leva a conversão da quitina em *N*-acetil-glicosamina, glicosamina até bioetanol. Eles construíram através da engenharia genética uma bactéria quitinolítica mutante capaz de degradar a quitina para produção de GlcNAc, mas que não é capaz de metabolizar GlcNAc e glicosamina (GlcN). Enquanto leveduras tais como *Saccharomyces cerevisiae* não possuem genes e a capacidade de utilizar *N*-acetil-glicosamina ou glicosamina, eles também construíram uma *S. cerevisiae* que é capaz de metabolizar *N*-acetil-glicosamina para produção de bioetanol. Eles observaram que essa levedura é capaz de produzir etanol quase tão rápido como quando glicose é utilizada como substrato.

2.4 Bactérias quitinolíticas no ecossistema marinho

A produção anual de quitina no ambiente marinho é muito discutida entre os pesquisadores, mas corresponde a valores que variam entre 10^6 a 10^{11} toneladas métricas anuais (JEUNIAUX e VOSS-FOUCART, 1991; JOHNSTONE, 1908). A maior parte dessa produção está na forma de carapaças de zooplâncton, seguido das carapaças de caranguejos, camarões, lagostas entre outras espécies marinhas (JEUNIAUX e GOODAY, 1986).

A importância ecológica da quitina no ambiente marinho foi descrita por Johnstone

(1908) quando afirmou que as águas oceânicas poderiam ter suas reservas de carbono e nitrogênio totalmente esgotadas em um curto espaço de tempo se as formas insolúveis de quitina não retornassem ao ecossistema em formas biologicamente utilizáveis. Porém, apesar da contínua e grande quantidade de quitina liberada no ambiente marinho nessas formas insolúveis, apenas traços desse polissacarídeo são encontrados nos sedimentos oceânicos (ALLDREDGE; GOTSCHALK, 1990; POULICEK; JEAUNIAUX, 1988). Assim, descobriu-se, em 1937, que certas bactérias atuavam degradando a quitina na coluna d'água através de enzimas denominadas quitinases e que essas bactérias denominadas “bactérias quitinolíticas” estavam amplamente distribuídas no ambiente marinho, explicando assim a baixa concentração desse polissacarídeo nos sedimentos oceânicos (KIRCHNER, 1995; ZOBELL; RITTENBERG, 1938).

A capacidade de degradação de quitina no ecossistema marinho tem sido observada por inúmeras bactérias de diferentes gêneros e espécies, tais como *Aeromonas hydrophila* (HIRAGA et al., 1997), *Aeromonas* sp. (DUMONTET et al., 1996), *Alteromonas* sp. (ORIKOSHI et al., 2005), *Vibrio cholerae* (LI; ROSEMAN, 2004), *Vibrio furnissi* (BASSLER et al., 1991; KEYHANI e ROSEMAN, 1999), *Vibrio harveyi* (SVITIL et al., 1997), *Vibrio anguillarum* e *Vibrio parahaemolyticus* (HIRONO et al., 1998), *Salinivibrio costicola* (AUNPAD; PANBANGRED, 2003), *Streptomyces* sp. (HAN et al., 2009), *Moritella marina* (STEFANIDI; VORGIAS, 2008), entre outras. Essas bactérias têm sido encontradas em associação ou no conteúdo estomacal de peixes marinhos (LINDSAY; GOODAY, 1990; ITOI et al., 2007), em copépodes (DUMONTET et al., 1996), em carapaças de camarão (BRZEZINSKA et al., 2008) e caranguejo (JUAREZ-JIMENEZ et al., 2008), em associação com esponjas marinhas (HAN et al., 2009) e livres na coluna d'água (GOODAY, 1990).

Um grande interesse pela busca de novos produtos bioativos naturais tem ocorrido nas últimas décadas e, com isso, viu-se no ambiente marinho um campo bastante atrativo e pouco explorado do ponto de vista biotecnológico e microbiológico (KELECOM, 1999; FREITAS et al., 2012). Bactérias quitinolíticas presentes no ambiente marinho podem ser muito úteis para aplicações biotecnológicas devido ao eficiente papel que desempenham no ciclo de nutrientes e a expressão de diferentes quitinases que podem ser empregadas para produção de derivados de quitina (DAHIYA et al., 2006).

2.5 Caracterização da atividade quitinolítica bacteriana

Tipicamente a atividade quitinolítica bacteriana pode ser avaliada pela capacidade de formar halos de hidrólise ao redor das colônias quando cultivadas em meio de cultura sólido contendo quitina como única fonte de carbono. Nesse caso, os diâmetros dos halos indicam o potencial de produção de quitinases (AKUTSU *et al.*, 1993; AVELIZAPA *et al.*, 1999; CODY *et al.*, 1990; HOWARD *et al.*, 2003).

Entretanto, outras metodologias podem ser aplicadas para verificar a formação dos produtos de degradação como a identificação e quantificação dos produtos de degradação de quitina. Uma delas é que está sendo frequentemente realizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BASSLER *et al.*, 1991; KEYHANI; ROSEMAN, 1996; TANAKA *et al.*, 2001; SUGINTA, 2007). Essa técnica cromatográfica é uma das mais empregadas na atualidade e apresenta muitas vantagens para análises de combinações orgânicas. Amostras não voláteis e termolábeis são preferencialmente analisadas por HPLC devido à agilidade, sensibilidade e precisão nas medições realizadas pelo equipamento. Apesar do alto custo, essa metodologia possui a vantagem de poder ser empregada em inúmeros experimentos que envolvem diversos tipos de substâncias, tais como fitoterápicos, aminoácidos, pesticidas, proteínas, antibióticos, hidrocarbonetos, carboidratos, drogas e pesticidas (COLLINS *et al.*, 1993).

Assim também durante a hidrólise da quitina podem ser obtidos os açúcares. Neste sentido, os monômeros, dímeros, trimeros e oligossacarídeos obtidos que sejam solúveis em água podem ser quantificados como açúcares solúveis totais (AST) (HOROWITZ, *et al.*, 1957). Vários métodos foram descritos para a quantificação de açúcares solúveis totais, sendo os mais conhecidos o Método de Somogy-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGY, 1945) e o Método da Antrona (YEMM; WILLIS, 1954). Para a determinação dos açúcares solúveis totais, o método mais adequado é o de antrona. Esse composto é um hidroxiantranceno, uma substância estável com ponto de fusão a 154°C. A reação é realizada em meio fortemente ácido, onde há hidrólise dos açúcares e a formação de furfurais, os quais reagem com a antrona formando um produto de coloração azul-esverdeada, que é quantificado colorimetricamente a 620 nm (YEMM; WILLIS, 1954).

Outra forma de medir ou caracterizar a atividade quitinolítica de organismos é a detecção e quantificação de enzimas. Muitas quitinases foram descritas, entretanto, quitinases específicas tais como *N*-acetil-glicosaminidases, quitobiosidases e endoquitinases tem sido avaliadas através do uso de análogos sintéticos de *N*-acetil-glicosamina ou oligossacarídeos de

quitina ligados ao *p*-nitrofenol. A hidrólise desses análogos pelas enzimas libera *p*-nitrofenol (4-nitrofenol), o qual após ionização em pH básico, pode ser colorimetricamente medido a 405 nm (BASSLER et al., 1991; HOWARD, 2003; KEYHANI; ROSEMAN, 1999; SOUZA, 2009; SUGINTA, 2007; SVITIL et al., 1997; TRONSMO; HARMAN, 1993).

Outro método utilizado para detecção de atividade quitinolítica é baseado na dosagem dos açúcares redutores formados a partir da degradação da quitina coloidal. Porém, esse tipo de método colorimétrico não especifica quais as enzimas quitinolíticas atuaram no processo de hidrólise da quitina coloidal (GARCIA, 1993; FRÄNDBERG; SCHNÜRER, 1994a; HOWARD et al., 2003).

2.6 Condições de cultivo de bactérias quitinolíticas

No cultivo bacteriano é necessário fornecer condições adequadas ao crescimento e manutenção celular. Basicamente, os meios de cultura utilizados para o cultivo de microrganismos são constituídos por uma fonte de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e elementos traços (LIMA et al., 2001).

O isolamento de bactérias quitinolíticas a partir de fontes naturais, tais como água do mar e plâncton marinho, é uma ferramenta poderosa para selecionar bactérias com elevada atividade quitinolítica. No entanto, o sucesso para obtenção de microrganismos viáveis depende de um meio de cultura adequado.

A utilização de meios de cultura contendo sais minerais e apenas quitina, como única fonte de carbono, tem sido uma das metodologias mais utilizadas para o isolamento e estudo de bactérias quitinolíticas por ser barato e facilitar a identificação bacteriana (SOUZA et al., 2009), uma vez que as quitinases produzidas pelas bactérias quitinolíticas são capazes de se difundir no meio de cultura e formar um halo de degradação ao redor das colônias (HOWARD et al., 2003).

A dificuldade dos estudos envolvendo bactérias quitinolíticas está relacionado a insolubilidade da quitina bruta. Dessa forma, vários pesquisadores recomendam o uso de quitina coloidal por ser uma forma de quitina mais solúvel em água (SKUJINS et al., 1965; AKUTSU et al., 1993; AVELIZAPA et al., 1999; HOWARD et al., 2003).

A metodologia para preparação da quitina coloidal constitui um processo muito discutido entre pesquisadores e um tanto trabalhoso (HIRANO; NAGAO, 1988; RAMÍREZ et al., 2004; ROBERTS; SELITRENNIKOFF, 1988; RODRIGUEZ-KABANA et al., 1983; SKUJINS et al., 1965; WEN et al., 2002; YABUKI et al., 1986). No entanto, em um estudo

realizado por Souza e colaboradores (2009) através da comparação de duas metodologias foi possível obter a quitina coloidal utilizando um processo rápido, simples, barato e que permite sua aplicação no cultivo de bactérias quitinolíticas e ensaios envolvendo os estudos de quitinases.

O cultivo de bactérias quitinolíticas de origem marinha depende do entendimento das condições ambientais e ecológicas para que seja possível o estabelecimento de condições essenciais durante a avaliação do crescimento e da atividade quitinolítica. Fatores abióticos como temperatura, pH, atividade de água (A_w), concentração de oxigênio e concentração de nutrientes são fundamentais para o crescimento microbiano e podem afetar intensamente o desenvolvimento e manutenção celular. Dessa forma, durante o cultivo bacteriano deve se levar em consideração suas necessidades físicas e químicas, as quais devem representar aquelas existentes em seu habitat natural (TAKAGI et al., 2006; TSENG; LENG, 2011).

2.7 Caracterização molecular do gênero *Aeromonas*

Por mais que bactérias do gênero *Aeromonas* possam ser encontradas praticamente em todos os ambientes, hoje esse gênero é considerado quase sinônimo de ambientes aquáticos e podem ser isoladas de rios, lagos, oceanos, águas subterrâneas e esgotos (JANDA; ABBOTT, 2010).

Algumas cepas de *Aeromonas* estão envolvidas em diferentes doenças em peixes e vários estudos têm investigado seu papel nas infecções humanas (KOBAYASHI et al., 2009; MCCOY et al., 2010; SHA et al., 2009). No entanto, por mais que recentes estudos relataram a presença de genes associados à virulência em *Aeromonas* nas infecções de peixes (BOYD et al., 2008; DACANAY et al., 2010; LI et al., 2011), ainda existe um grande desafio que visa estabelecer uma relação inequívoca entre as espécies desse gênero, pois apenas um pequeno subconjunto de cepas contendo genes associados à virulência pode causar infecção ou diarreia (JANDA; ABBOTT, 2010). Assim, um considerável esforço tem sido dirigido para o desenvolvimento de métodos para identificação e classificação de diferentes espécies do gênero *Aeromonas*, especialmente aquelas apontadas como patógenos humanos.

A classificação dos microrganismos com base em métodos tradicionais (morfológicos, fisiológicos e bioquímicos) não é atualmente uma designação de confiança de seu status taxonômico. Assim, uma abordagem mais abrangente e pragmática é necessária para fornecer informações convincentes na caracterização bacteriana. Métodos moleculares baseados nas sequências de DNA se tornaram mais populares e amplamente utilizados devido a sua

reprodutibilidade, simplicidade e elevado poder discriminatório (PRAKASH et al., 2007). Vários métodos moleculares para distinguir espécies de *Aeromonas* foram aplicados nas últimas décadas, tais como 16S rRNA, hibridização DNA-DNA, ribotipagem, RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), (RFLP) (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*) e multiplex PCR (CHANG et al., 2008; HUYS, et al., 1996; JOSEPH; CARNAHAN, 1994; MARTÍNEZ-MURCIA, 1999; NASH et al., 2006; SAAVEDRA et al., 2007). No entanto, a maioria destes métodos são muito trabalhosos, não são reproduzíveis, e na maioria dos casos não fornecem resultados satisfatórios (JANDA; ABBOTT, 2010).

A limitada heterogeneidade intragenômica do gene 16S rRNA entre as espécies de *Aeromonas* sugere que identificações baseadas em um único gene podem não ser apropriadas para a caracterização deste gênero (MORANDI et al., 2005). Assim, em 1998, MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) foi proposto como um método rápido, simples para a delimitação das espécies (MAIDEN et al., 1998) e útil para a caracterização de bactérias com sequências polimórficas em *housekeeping* genes. Esses genes são responsáveis pela codificação de proteínas que desempenham papéis fundamentais nos processos celulares e vários estudos descrevem sua utilização, bem como o emprego da técnica de MLSA para identificação de bactérias em nível de espécie (FIGUEIRA et al., 2011; GIRLICH et al., 2011; JANDA; ABBOTT, 2010; KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2007; MARTINO et al., 2011; THOMPSON et al., 2004). Na técnica de MLSA, cada fragmento do gene é amplificado separadamente, e cada isolado é classificado como uma análise de sequência (SA) pela combinação das sequências obtidas pela amplificação dos *housekeeping* genes (URWIM; MAIDEN, 2003). Dessa maneira, esse tipo de análise é eficaz para a identificação de espécies e é extremamente útil para a determinação de ordens de ramificação na evolução (YAMAMOTO et al., 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar as condições ótimas de cultivo, avaliar a degradação de quitina e caracterizar por sequenciamento 12 bactérias quitinolíticas do gênero *Aeromonas* isoladas do ecossistema marinho.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar molecularmente 12 bactérias quitinolíticas do gênero *Aeromonas* através do sequenciamento total do gene 16S rRNA.
- Caracterizar molecularmente 12 bactérias quitinolíticas do gênero *Aeromonas* por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) utilizando três *housekeeping* genes (*recA*, *rpoB* e *rpoD*).
- Avaliar as condições de cultivo de 12 bactérias quitinolíticas do gênero *Aeromonas* a partir de três variáveis selecionadas (temperatura, concentração de quitina e pH).
- Avaliar o comportamento de 12 bactérias quitinolíticas na degradação de quitina durante 96 horas de cultivo através de três metodologias: medida do halo de hidrólise de quitina, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e o teste de Antrona.
- Avaliar a atividade das enzimas *N*-acetil-glicosaminidase, quitobiosidase e endoquitinase produzidas pelas 12 bactérias quitinolíticas do gênero *Aeromonas* durante 96 horas de cultivo.
- Avaliar o perfil enzimático de 12 bactérias quitinolíticas do gênero *Aeromonas* quando cultivadas em caldo mineral com quitina por 96 horas utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de bactérias quitinolíticas

Doze isolados do gênero *Aeromonas* parcialmente sequenciados pelo gene 16S rRNA foram selecionados para esse estudo. Os mesmos foram isolados de amostras de água do mar e plâncton da região costeira do estado de São Paulo (Tabela 1). Esses isolados foram selecionados por serem aqueles que apresentaram maior atividade quitinolítica quando avaliados após 96 horas de cultivo a temperatura de 28°C (SOUZA, 2009).

Tabela 1 - Relação dos isolados incluídos no estudo por tipo de amostra e origem de isolamento

Isolado	Origem da amostra	Local de origem
CH101	Água do mar	Canal de São Sebastião
CH147	Água do mar	Baixada Santista
CH149	Água do mar	Baixada Santista
CH150	Água do mar	Baixada Santista
CH151	Água do mar	Baixada Santista
CH125	Água do mar	Baixada Santista
CH129	Água do mar	Baixada Santista
CH141	Água do mar	Baixada Santista
CH286	Água do mar	Baixada Santista
CHZ52	Plâncton	Baixada Santista
CHZ113	Plâncton	Canal de São Sebastião
CHZ306	Plâncton	Baixada Santista

FONTE: CARDOZO, 2012.

4.2 Reisolamento de bactérias quitinolíticas

Os isolados foram semeados em placas de petri contendo ágar mineral [(NH₄)₂SO₄, 1,0 g.L⁻¹; KH₂PO₄, 0,2 g.L⁻¹; K₂HPO₄, 1,6 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0,2 g.L⁻¹; NaCl, 0,1 g.L⁻¹; FeSO₄.7H₂O, 0,01 g.L⁻¹; CaCl₂.2H₂O, 0,02 g.L⁻¹; Ágar, 15,0 g.L⁻¹ (FURUKAWA et al., 1978)] com 12,0 g.L⁻¹ de quitina coloidal (SOUZA et al., 2009), pH 7,0 para verificar sua pureza e viabilidade. As placas foram incubadas a 28 °C durante 96 horas.

A preparação da quitina coloidal foi realizada adicionando-se 60 mL de HCl fumegante (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a um Erlenmeyer contendo 5 g de quitina (α -quitina) em pó de carapaça de camarão (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) e agitado constantemente a 180 rpm por uma hora a temperatura ambiente. Após o período de agitação, 200 mL de álcool etílico a 50% foram adicionados ao Erlenmeyer e agitado vigorosamente

para precipitação da quitina e formação dos colóides. O precipitado foi transferido para um funil com papel de filtro (80 g) e lavado com água destilada estéril até atingir o pH 7,0 (SOUZA et al., 2009).

4.3 Caracterização molecular pelo sequenciamento de genes

4.3.1 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico das bactérias foi realizada utilizando o Kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.2 Amplificação de genes utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.3.2.1 Gene 16S rRNA

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL utilizando os seguintes reagentes: 5 µL de solução tampão 10X (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 1,25 µL de solução mix de dNTPs a 10 mM (Invitrogen), 0,75 µL de cada solução dos iniciadores 27F e 1525R a 20 µM (Invitrogen) (Figura 03), 0,4 µL da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen), 39,35 µL de água ultra pura e 1,0 µL de DNA (50 ng/µL). Como controle positivo foi incluído o DNA de *E. coli* ATCC 25922 e água ultra pura como controle negativo.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf, Nova York, NY, Estados Unidos) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação (94 °C por 30 segundos/ 62,5 °C por 1 minuto/ 72 °C por 45 segundos) e uma extensão final a 72 °C por 3 minutos.

4.3.2.2 Gene *recA*

As amplificações foram realizadas em um volume final de 50 µL utilizando os seguintes reagentes: 5,0 µL de solução tampão 10X (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 5,0 µL de solução mix de dNTPs a 2,5 mM (Invitrogen), 1,25 µL de cada solução dos iniciadores *recA01F* e *recA02R* a 20 µM (Invitrogen) (Figura 03), 0,5 µL da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen), 34,5 µL de água ultra pura e 1,0 µL de DNA (50 ng/µL). Como controle positivo foi incluído o DNA de *E. coli* ATCC 25922 e água ultra pura como

controle negativo.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 3 ciclos iniciais (95 °C por 1 minuto/ 46 °C por 2 minutos e 15 segundos/ 72 °C por 1 minuto e 15 segundos), mais 30 ciclos de amplificação (95 °C por 35 segundos/ 46 °C por 1 minutos e 15 segundos/ 72 °C por 1 minuto e 15 segundos) e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

4.3.2.3 Gene *rpoB*

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL utilizando os seguintes reagentes: 5,0 µL de solução tampão 10X (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 3,0 µL de solução mix de dNTPs a 2,5 mM (Invitrogen), 1,0 µL de cada solução dos iniciadores pasrpoB-F e rpoB-R a 20 µM (Invitrogen) (Figura 03), 0,2 µL da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen), 37,3 µL de água ultra pura e 1,0 µL de DNA (50 ng/µL). Como controle positivo foi incluído o DNA de *E. coli* ATCC 25922 e água ultra pura como controle negativo.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação (94 °C por 30 segundos/ 54 °C por 30 segundos/ 72 °C por 30 segundos) e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

4.3.2.4 Gene *rpoD*

As amplificações do gene foram realizadas em um volume final de 50 µL utilizando os seguintes reagentes: 5,0 µL de solução tampão 10X (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 2,0 µL de solução mix de dNTPs a 2,5 mM (Invitrogen), 0,75 µL de cada solução dos iniciadores rpoD70F e rpoD70R a 20 µM (Invitrogen) (Figura 03), 0,4 µL da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen), 39,35 µL de água ultra pura e 1,0 µL de DNA (50 ng/µL). Como controle positivo foi incluído o DNA de *E. coli* ATCC 25922 e água ultra pura como controle negativo.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação (94 °C por 1 minuto/ 59 °C por 45 segundos/ 72 °C por 2 minutos) e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

4.3.3 Visualização dos fragmentos amplificados de DNA

Os fragmentos amplificados de DNA foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio Rad, São Paulo, SP, Brasil).

4.3.4 Purificação e sequenciamento dos fragmentos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram purificados utilizando o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, os produtos das reações de PCR purificados foram submetidos ao sequenciamento utilizando os iniciadores descritos na Figura 03. O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser, de acordo com o protocolo utilizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

Figura 3 - Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA, *recA*, *rpoB* e *rpoD*

Gene	Primer	Sequencia (5'-3')	Aplicação	Referência
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Amplificação e Sequenciamento	LANE, 1991
	530F	CAGCAGCCGCGGTAATAC	Sequenciamento	VOSSBRINCK et al., 1993
	782R	ACCAGGGTATCTAATCCTGT	Sequenciamento	CHUN, 1995
	1041R	CGGTGTGTACAAGACCC	Sequenciamento	NUBEL et al., 1996
	1525R	AAGGAGGTGWTCARCC	Amplificação e Sequenciamento	LANE, 1991
<i>recA</i>	recA01F	TGARAARCARTTYGGTAAAGG	Amplificação e Sequenciamento	THOMPSON et al., 2005
	recA02R	TCRCCNTRTAGCTRTACC	Amplificação e Sequenciamento	
<i>rpoB</i>	pasrpoB-F	GCA GTGAAAGARTTCTTTGGTTC	Amplificação e Sequenciamento	KORCZAK et al., 2004
	rpoB-R	GTTGCATGTTNGNACCCAT	Amplificação e Sequenciamento	
<i>rpoD</i>	rpoD70F	ACGACTGACCCGGTACGCATGTA	Amplificação e Sequenciamento	YAMAMOTO et al., 2000
	rpoD70Fs	YATGMGNGARATGGGNACNGT	Sequenciamento	YAMAMOTO et al., 2000
	rpoD70Fs1	GTCAATTCCGCCTGATGC	Sequenciamento	SOLER et al., 2004
	rpoD70R	ATAGAAATAACCAGACGTAAGT	Amplificação e Sequenciamento	YAMAMOTO et al., 2000
	rpoD70Rs	TNGCYTCNACCATYTCYTTYTT	Sequenciamento	YAMAMOTO et al., 2000
	rpoD70Rs1	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT	Sequenciamento	YAMAMOTO et al., 2000
	rpoD70Rs1	ATCATCTCGCGCATGTTGT	Sequenciamento	SOLER et al., 2004

FONTE: CARDOZO, 2012.

4.4 Avaliação das condições de cultivo

Todos os isolados foram submetidos às diferentes condições de cultivo pré-determinadas: (1) temperatura (28 °C e 37 °C); (2) concentração de quitina (0,5%, 1,2% e 2,5%) e (3) pH (6,0, 7,0 e 8,0). Cada isolado foi avaliado de acordo com a variável definida em cada etapa.

4.4.1 Preparação do inóculo para uso nos ensaios

Os isolados foram semeados em placas de ágar mineral contendo 1,2% de quitina coloidal e incubados a 28 °C por 96 horas. Uma colônia bacteriana foi removida de cada placa, inoculada em tubos contendo 20 mL de caldo mineral com 1,2% de quitina coloidal e incubados a 28 °C por 96 horas sob agitação constante a 180 rpm (Figura 4). A concentração bacteriana inicial utilizada em todos os ensaios foi de aproximadamente $5,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹. A concentração foi determinada pela contagem de bactérias em placa.

4.4.2 Avaliação do crescimento bacteriano

A contagem bacteriana foi realizada pelo método de contagem em placa. Primeiramente foram preparadas diluições em série 1:10 em solução salina 0,85% até 10⁻⁷. Em seguida, 100 µL das três últimas diluições foram inoculados em placas contendo ágar mineral com 1,2% de quitina pelo método de espalhamento em superfície usando pérolas de vidro estéreis. A contagem das colônias foi realizada após 96 horas de incubação selecionando aquelas placas que tiveram o crescimento entre 30 e 300 UFC.

4.4.3 Avaliação da variável temperatura no cultivo de bactérias quitinolíticas

Foi retirado 1 mL da suspensão bacteriana (item 4.4.1), inoculado em Erlenmeyers contendo 100 mL de caldo mineral com 1,2% de quitina coloidal em pH 7,0 e incubados em duas temperaturas (28 °C e 37 °C) sob agitação constante a 180 rpm por 96 horas. O crescimento dos isolados foi avaliado nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas de acordo como descrito no item 4.4.2.

4.4.4 Avaliação da variável concentração de quitina no cultivo de bactérias quitinolíticas

Foi retirado 1 mL da suspensão bacteriana (item 4.4.1), inoculado em Erlenmeyers contendo 100 mL de caldo mineral contendo diferentes concentrações de quitina coloidal (0,5%, 1,2% e 2,5%) em pH 7,0 e incubados sob agitação constante a 180 rpm por 96 horas. A temperatura de incubação foi definida após a análise dos resultados obtidos no experimento descrito no item 4.4.3. O crescimento dos isolados foi avaliado nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas de acordo como descrito no item 4.4.2.

4.4.5 Avaliação da variável pH no cultivo de bactérias quitinolíticas

Foi retirado 1 mL da suspensão bacteriana (item 4.4.1), inoculado em Erlenmeyers contendo 100 mL de caldo mineral contendo a concentração de quitina coloidal definida após

análise dos resultados obtidos no item 4.4.4 e incubados sob agitação constante a 180 rpm por 96 horas. A inoculação foi realizada em caldos contendo diferentes valores de pH (6,0, 7,0 e 8,0) e a temperatura de incubação foi definida após a análise dos resultados obtidos no experimento descrito no item 4.4.3. O crescimento dos isolados foi avaliado nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas de acordo como descrito no item 4.4.2.

O resumo do processo realizado para avaliação das condições de cultivo pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Metodologia aplicada para avaliação das condições de cultivo das bactérias quitinolíticas

FONTE: CARDOZO, 2012.

4.5 Avaliação da degradação de quitina por bactérias quitinolíticas

A degradação de quitina foi avaliada utilizando três metodologias: medida do diâmetro

do halo de hidrólise de quitina em ágar mineral, quantificação dos monômeros (*N*-acetilglicosamina), dímeros (quitobiose) e trímeros (quitotriose) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e dos açúcares solúveis totais (AST) liberados durante 96 horas de cultivo. Durante a avaliação da degradação de quitina pelas bactérias quitinolíticas, foi verificado a concentração bacteriana, a atividade enzimática, o perfil de proteínas e a variação dos valores de pH durante o período de incubação de 96 horas.

4.5.1 Preparação das amostras do cultivo de bactérias quitinolíticas para avaliar a degradação da quitina

O inóculo foi preparado como descrito no item 4.4.1. Cinco mililitros da suspensão bacteriana foram inoculados em Erlenmeyers contendo 500 mL de caldo mineral com quitina coloidal como única fonte de carbono. A temperatura, concentração de quitina e pH utilizados para o cultivo de cada isolado foram definidos após análise dos resultados obtidos no item 4.4. Os isolados foram incubados sob agitação constante a 180 rpm por um período de 96 horas.

Para avaliação da degradação da quitina, oito mililitros de cada cultivo foram retirados nos períodos 0, 24, 48, 72 e 96 horas para realização dos ensaios. Alíquotas de 1,0 e 1,5 mL foram retiradas após homogeneização e utilizadas para avaliação do crescimento de bactérias quitinolíticas e medida do pH, respectivamente. O crescimento das bactérias quitinolíticas foi avaliado em duplicata pela contagem em placa, de acordo com o procedimento descrito no item 4.4.2. O pH foi verificado utilizando o pHmetro SevenEasyTM (Mettler Toledo, Barueri, SP, Brasil).

Os 5,5 mL restantes foram centrifugados a 3.000 g por 5 minutos a 28 °C para obtenção do sobrenadante que foram utilizados para avaliar a degradação de quitina, atividade enzimática e perfil proteico.

4.5.2 Avaliação da degradação de quitina

4.5.4.1 Avaliação da degradação de quitina em meio sólido

A degradação de quitina foi avaliada pela medida do diâmetro do halo de hidrólise produzido após o cultivo das bactérias quitinolíticas em ágar mineral contendo quitina como única fonte de carbono. O ensaio foi realizado inoculando 100 µL do cultivo bacteriano (item 4.5.1) após diluições em série 1:10 em solução salina 0,85%. A semeadura foi realizada em placas contendo ágar mineral com 1,2% de quitina pelo método de espalhamento em

superfície usando pérolas de vidro estéreis e incubado a 28 °C por 96 horas.

A medida do halo de hidrólise foi obtida com o auxílio de um paquímetro digital. As medidas foram realizadas no sentido vertical e horizontal dos halos de hidrólise e das colônias de cada isolado. As medidas foram realizadas em três colônias de cada isolado selecionadas aleatoriamente. A medida do halo correspondeu à média das medidas dos halos no sentido vertical e horizontal subtraindo a medida das colônias no sentido vertical e horizontal.

4.5.4.2 Avaliação da degradação de quitina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A degradação de quitina foi avaliada através da quantificação dos monômeros (*N*-acetil-glicosamina), dímeros (quitobiose) e trímeros (quitotriose) liberados durante o período de 96 horas de cultivo. A cada 24 horas, 1,0 mL do sobrenadante obtido como descrito no item 4.5.1 foi aquecido a 95 °C durante 5 minutos para desnaturação das enzimas e armazenado a -20 °C. Para execução dos ensaios, as amostras foram transferidas para vials com capacidade de 2,0 mL (Allcrom, São Paulo, SP, Brasil) através de unidades filtrantes contendo membranas de 0,45 µm (Millipore, Billerica, M.A., Estados Unidos). A detecção dos produtos de degradação da quitina foi realizada através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BASSLER et al., 1991), utilizando o sistema de HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com espectrofotômetro UV Ultimate 3000 Diode Array Detector (Dionex) a 210 nm. A coluna utilizada foi a Aminex HPX-87H de 30 cm x 7,8 cm (Bio-Rad), a fase móvel foi constituída de H₂SO₄ 5 mM com fluxo de 0,8 mL/min e o volume de injeção de amostra foi de 10 µL. Soluções padrões de *N*-acetil-glicosamina, quitobiose e quitotriose (Sigma-Aldrich) foram preparadas para identificação dos tempos de retenção e construção das curvas padrões.

4.5.4.3 Avaliação da degradação de quitina pela quantificação de açúcares solúveis totais (AST)

A degradação de quitina foi avaliada através da quantificação de açúcares solúveis totais (AST) liberados durante o período de 96 horas de cultivo. A quantificação dos AST foi avaliada pelo método de antrona (YEMM e WILLIS, 1954). A cada 24 horas, 2,5 mL do sobrenadante obtido como descrito no item 4.5.1 foram aquecidos a 95 °C durante 5 minutos para desnaturação das enzimas e armazenados a -20 °C. Para execução dos ensaios, o reagente antrona (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) foi preparado adicionando-se 80 mg do reagente em 2 mL de água Milli-Q e em seguida, 40 mL de H₂SO₄ concentrado. Este reagente foi

preparado na hora do uso e sob resfriamento. Os ensaios foram conduzidos em duplicata adicionando-se primeiramente 1 mL da amostra e depois o reagente antrona, sendo esse sistema mantido em gelo. Os tubos foram homogeneizados em agitador do tipo vortex (Biosan, Belo Horizonte, MG, Brasil) e aquecidos a 95 °C durante 5 minutos. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 620 nm. A curva padrão foi obtida com uma solução de *N*-acetil-glicosamina (Sigma-Aldrich).

4.5.5 Avaliação da atividade de enzimas quitinolíticas

A atividade enzimática dos isolados foi avaliada através da quantificação das enzimas *N*-acetil-glicosaminidase, quitobiosidase e endoquitinase durante 96 horas de cultivo. A cada 24 horas, 200 µL do sobrenadante obtido como descrito no item 4.5.1 foram utilizados para avaliação da atividade enzimática utilizando o kit *Chitinase Assay* (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em duplicata e em cada experimento foram incluídos três controles negativos (soluções de substrato) e um controle positivo (quitinase de *Trichoderma viride*). Uma unidade (U) foi definida como a quantidade necessária para liberar 1,0 µmol de *p*-nitrofenol por minuto.

4.6 Avaliação do perfil enzimático de bactérias quitinolíticas

4.6.1 Preparação das amostras

A cada 24 horas, 800 µL de solução de sulfato de amônio 80% foram adicionados em 800 µL do sobrenadante obtido como descrito no item 4.5.1 para precipitação das enzimas e após homogeneização, foram centrifugados a 10.000 g por 20 minutos a 4 °C. O precipitado foi retirado e ressuspensão na proporção 1:1 em tampão de amostra Tris-HCl 0,35 M, pH 6,8, contendo 10 % de SDS, 36% de glicerol, 0,012% de azul de bromofenol e 5% de β-mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 95 °C durante 5 minutos e armazenadas a -20 °C.

4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O extrato enzimático dos isolados quitinolíticos foi analisado em eletroforese vertical com SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) utilizando o equipamento Mini-Protean (Bio-Rad). Foram utilizados géis de separação linear 12,5% (3,12 mL de acrilamida/bisacrilamida 30:1,6; 2,0 mL de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 2,28 mL de água Milli-Q; 74 µL de SDS 10%; 74 µL de persulfato de amônio 10%; 5 µL de TEMED) e géis de concentração (0,58 mL de

acrilamida/bisacrilamida 30:5,0; 0,44 mL de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 2,28 mL de água Milli-Q; 34 µL de SDS 10%; 34 µL de persulfato de amônio 10%; 5 µL de TEMED). Foram aplicados 25 µL de cada amostra no gel de poliacrilamida. O padrão de peso molecular utilizado foi o *PageRuler Unstained Protein Ladder* (10-200 kDa) (Fermentas, São Paulo, SP, Brasil). O tampão de corrida utilizado nos ensaios foi preparado com Tris 0,025 M, glicina 0,18 M e SDS 0,1% e a corrida eletroforética foi conduzida a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas a 150 volts.

Os géis de poliacrilamida foram corados pelo método da prata após a corrida eletroforética. O método com que os géis foram corados foi constituído de 7 etapas: A primeira etapa constituiu na submersão dos géis de poliacrilamida em solução fixadora (500 mL de metanol; 120 mL ácido acético; 500 µL.L⁻¹ de formaldeído 37%; q.s.p um litro de água destilada) por 20 minutos. A segunda etapa constituiu na submersão dos géis em álcool etílico 50% por 7 minutos e posteriormente lavado com água destilada. Esse procedimento foi repetido por três vezes. A terceira etapa constituiu na submersão dos géis em solução de pré-tratamento (0,2 g.L⁻¹ de tiosulfato de sódio) por 20 segundos e posteriormente lavado com água destilada por mais 20 segundos. Esse procedimento foi repetido por três vezes e a solução de pré-tratamento foi preparada no momento do ensaio. A quarta etapa constituiu na submersão dos géis em solução de coloração (2,0 g.L⁻¹ de nitrato de prata; 700 µL.L⁻¹ de formaldeído 37%; q.s.p um litro de água destilada) por 20 minutos. A quinta etapa constituiu na submersão dos géis em solução de revelação (60 g.L⁻¹ de carbonato de sódio; 500 µL.L⁻¹ de formaldeído 37%; 2,0 mg.L⁻¹ de tiosulfato de sódio; q.s.p um litro de água destilada) até o momento em que as bandas estavam claramente visíveis. Os géis foram lavados duas vezes com água destilada para retirada do excesso de solução. A sexta etapa constituiu na submersão dos géis em solução de parada (500 mL de metanol; 120 mL ácido acético; q.s.p um litro de água destilada) por 10 minutos. A sétima etapa constituiu na submersão dos géis em solução de lavagem (metanol a 50%) por 10 minutos. Os géis foram mantidos sob agitação em todas as etapas e fotografados no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio-Rad).

4.7 Análise dos resultados

4.7.1 Avaliação das condições de cultivo

Os resultados obtidos na avaliação das condições de cultivo e degradação de quitina foram interpretados por gráficos construídos com o programa GraphPad Prism (versão 5.0).

4.7.2 Análise das sequências obtidas pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *recA*, *rpoB* e *rpoD*

As sequências nucleotídicas obtidas pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *recA*, *rpoB* e *rpoD* tiveram seus cromatogramas analisados e editados no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9.0 e *Bionumerics* 5.10. Após a edição, as sequências obtidas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA foram comparadas com sequências disponibilizadas no RDP (*Ribosomal Database Project*) utilizando o algoritmo SeqMatch. As sequências obtidas pelo sequenciamento dos genes *recA*, *rpoB* e *rpoD* foram comparadas com as sequências presentes no banco de dados GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando o algoritmo BlastN (ALTSCHUL et al., 1990). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o programa *MEGA* 5.05 e o método de *Neighbour-joining* com *bootstrap* de 1000 repetições.

4.7.3 Análise dos perfis enzimáticos de bactérias quitinolíticas

Os perfis enzimáticos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram analisados pelo programa *Bionumerics* (Applied Maths), versão 5.10. A matriz de similaridade genética entre os isolados foi construída utilizando o Coeficiente de Dice e Jaccard separadamente e os agrupamentos foram realizados utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*). Foi utilizado o valor de 1% de posição de tolerância de bandas (*band position tolerance*) para comparação dos fragmentos.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização molecular pelo sequenciamento de genes

5.1.1 Gene 16S rRNA

As sequências obtidas pelo sequenciamento de aproximadamente 1400 nucleotídeos do gene 16S rRNA foram comparadas com as sequências disponibilizadas no RDP (*Ribosomal Database Project*) e observou-se que todos os isolados pertencem ao gênero *Aeromonas*. No entanto, observou-se a partir da matriz de similaridade do programa *Mega* 5.05 que todos os isolados apresentaram similaridade (>99%) com quatro espécies diferentes desse gênero (*Aeromonas punctata*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas aquariorum* e *Aeromonas caviae*). A partir da construção da árvore filogenética (Figura 5), observou-se que os isolados CH125, CH129, CH141, CH149 e CHZ113 foram aqueles que ficaram mais agrupados com essas quatro espécies do gênero *Aeromonas*.

Figura 5 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA das bactérias quitinolíticas

Nota: Os valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

FONTE: CARDOZO, 2012.

5.1.2 Gene *recA*

As sequências obtidas pelo sequenciamento de aproximadamente 700 nucleotídeos do gene *recA* foram comparadas com as sequências disponibilizadas no GenBank do NCBI. Através das sequências desse gene, também foi observado que todos os isolados pertencem ao gênero *Aeromonas*. No entanto, observou-se a partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05* que os isolados apresentaram similaridade (>99%) com duas espécies do gênero *Aeromonas* (*Aeromonas punctata* e *Aeromonas caviae*). A partir da construção da árvore filogenética (Figura 6), observou-se que os isolados CH101, CH141, CH147, CH150 e CH151 ficaram agrupados com *Aeromonas caviae* e os isolados CH125, CH129, CH149, CH286, CHZ113 e CHZ52 com *Aeromonas punctata* e *Aeromonas caviae*.

Figura 6 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *recA* das bactérias quitinolíticas

Nota: Os valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

FONTE: CARDOZO, 2012.

5.1.3 Gene *rpoB*

O sequenciamento de aproximadamente 530 nucleotídeos do gene *rpoB* foram comparados com as sequências disponibilizadas no GenBank do NCBI. Observou-se através das sequências desse gene que todos os isolados pertencem ao gênero *Aeromonas*, mas que a partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05*, os isolados apresentaram similaridade (>99%) com duas espécies do gênero *Aeromonas* (*Aeromonas punctata* e

Aeromonas caviae). Observou-se a partir da construção da árvore filogenética (Figura 7) que com exceção do isolado CH129, todos os isolados estão mais relacionados com *Aeromonas punctata*. Já o isolado CH129, está mais relacionado com *Aeromonas hydrophila*.

Figura 7 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *rpoB* das bactérias quitinolíticas

Nota: Os valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

FONTE: CARDOZO, 2012.

5.1.4 gene *rpoD*

As sequências obtidas pelo sequenciamento de aproximadamente 850 nucleotídeos do gene *rpoD* foram comparadas com as sequências disponibilizadas no GenBank do NCBI. As sequências desse gene mostraram que todos os isolados pertencem ao gênero *Aeromonas*. No entanto, observou-se a partir da matriz de similaridade do programa *Mega* 5.05 que os isolados também apresentaram similaridade (>99%) com *Aeromonas punctata* e *Aeromonas*

caviae. A partir da construção da árvore filogenética (Figura 8), observou-se que o isolado CH101 ficou agrupado com *Aeromonas caviae* e que o isolado CHZ52 ficou agrupado com *Aeromonas punctata*, mas que os demais isolados podem representar duas espécies (*Aeromonas punctata* e *Aeromonas caviae*).

Figura 8 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *rpoD* das bactérias quitinolíticas

Nota: Os valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

FONTE: CARDOZO, 2012.

5.2 Avaliação das condições de cultivo

5.2.1 Cultivo e contagem de bactérias quitinolíticas

Os isolados foram inoculados em tubos contendo 20 mL de caldo mineral com 1,2% de quitina coloidal. Após 96 horas de incubação a 28 °C sob agitação constante a 180 rpm foi possível observar o crescimento dos isolados e a degradação de quitina em tubos (Figura 9).

Figura 9 - Cultivo de bactérias quitinolíticas em caldo mineral com quitina antes e após 96 horas

FONTE: CARDOZO, 2012.

A contagem bacteriana foi realizada pelo método de contagem em placa. Na Figura 10 pode ser observado o crescimento dos isolados em meio mineral com quitina coloidal após diluições em série 1:10 em solução salina 0,85%. Os halos de hidrólise de quitina podem ser claramente visualizados após o cultivo pelo método de espalhamento em superfície (*spread plate*) utilizando pérolas de vidro.

Figura 10 - Crescimento de bactérias quitinolíticas semeadas pelo método de espalhamento em superfície (*Spread plate*)

FONTE: CARDOZO, 2012.

5.2.2 Avaliação das variáveis selecionadas

5.2.2.1 Temperatura

Foi observado que todos os isolados apresentaram maiores concentrações (unidades formadoras de colônias - UFC.mL⁻¹) à 28 °C quando comparado a temperatura de 37 °C (Figura 11 e Apêndice A e B). No entanto, os isolados CH147, CH149, CH129, CHZ52 e CH286 apresentaram crescimento semelhante nas duas temperaturas nas primeiras 24 horas, mas nos demais tempos avaliados (48, 72 e 96 horas) apresentaram uma redução do número de células viáveis na temperatura de 37°C de até 3 escalas logarítmicas. Já os isolados CH101, CH150, CH141, CHZ113 e CHZ306 foram aqueles que apresentaram menor crescimento na temperatura de 37 °C desde as primeiras 24 horas de cultivo, sendo que três isolados (CH150, CH141 e CHZ113) apresentaram uma diferença de até 6 escalas logarítmicas.

Figura 11 - Crescimento máximo das bactérias quitinolíticas quando expostas às temperaturas de 28 e 37 °C, independentes do período de cultivo

FONTE: CARDOZO, 2012.

5.2.2.2 Concentração de quitina

Observou-se que nove isolados (CH101, CH147, CH149, CH150, CH151, CH129, CH141, CH286 e CHZ52) apresentaram maiores concentrações quando cultivados a 2,5% de quitina, mas somente os isolados CH141 e CH286 tiveram crescimento significativamente superior (≥ 1 escala logarítmica) em relação às concentrações apresentadas pelos demais isolados (Figura 12 e Apêndice C e D). Porém, esses isolados atingiram o crescimento

máximo em diferentes períodos, sendo CH141 a 24 horas e CH286 a 48 horas. Os demais isolados também atingiram o crescimento máximo em diferentes períodos sendo CH101, CH147, CH149 e CHZ52 a 24 horas e CH150, CH151 e CH129 a 48 horas. Os isolados CH125, CHZ113 e CHZ306 atingiram maiores concentrações em meio mineral contendo 1,2% de quitina e também em diferentes períodos, sendo CH125 e CHZ113 a 24 horas e CHZ306 a 48 horas.

Relacionado ao crescimento dos isolados em diferentes concentrações de quitina e independente do período, foi observado que o crescimento máximo de alguns isolados (CH101, CH141, CH147 e CHZ52) foi relativamente proporcional à quantidade de substrato presente no meio, ou seja, esses isolados atingiram maiores concentrações na medida em que foram expostos a maiores concentrações de quitina (Figura 12 e Apêndice D). No entanto, no caso de alguns isolados (CH129, CH147, CH149 e CH151), o crescimento máximo no meio mineral contendo 0,5% de quitina foi relativamente semelhante quando cultivados no meio mineral contendo 1,2% de quitina.

Figura 12 - Crescimento máximo das bactérias quitinolíticas quando expostas a diferentes concentrações de quitina, independentes do período de cultivo

FONTE: CARDOZO, 2012

5.2.2.3 pH

A partir dos resultados obtidos pelo cultivo dos isolados nos pH 6,0, 7,0 e 8,0 (Figura 13 e 14 e Apêndice E, F e G), foi observado que quatro isolados (CH147, CH151, CH129 e CHZ52) atingiram maiores concentrações em pH 6,0, um isolado (CH101) em pH 7,0 e sete isolados (CH149, CH150, CH125, CH141, CH286, CHZ113 e CHZ306) em pH 8,0. Com

exceção do isolado CH149 que atingiu o crescimento máximo a 48 horas, todos os isolados atingiram o crescimento máximo a 24 horas.

Diante do cultivo das bactérias quitinolíticas em meio mineral contendo 2,5% de quitina e diferentes valores de pH (Figura 13 e Apêndice E e F), observou-se que o crescimento máximo do isolado CH101 foi semelhante nos pH 6,0 e 8,0, mas quando cultivado em pH 7,0 obteve crescimento ligeiramente superior. O crescimento máximo do isolado CHZ52 foi semelhante nos pH 7,0 e 8,0, mas obtendo maior crescimento em pH 6,0. Já o crescimento máximo do isolado CH141 foi semelhante nos pH 6,0 e 7,0, mas com crescimento superior quando cultivado em pH 8,0. Os isolados CH129 e CH151 obtiveram crescimento máximo em pH 6,0 e superior (≥ 01 escala logarítmica) quando comparado ao cultivo em pH 7,0. O isolado CH149 obteve maior crescimento em pH 8,0 e superior (> 01 escala logarítmica) ao pH 7,0. Já os isolados CH147 e CH286 foram aqueles que tiveram o crescimento máximo semelhante nos três pH, mas de maneira ligeiramente superior em pH 6,0 e 8,0, respectivamente.

Figura 13 - Crescimento máximo das bactérias quitinolíticas cultivadas em meio mineral contendo 2,5% de quitina quando expostas a diferentes valores de pH

FONTE: CARDOZO, 2012

Os isolados CH125, CHZ113 e CHZ306 cultivados em meio mineral contendo 1,2% de quitina e diferentes valores de pH obtiveram maior crescimento em pH 8,0 (Figura 14 e Apêndice E e G). No entanto, os isolados CH125 e CHZ306 obtiveram crescimento máximo semelhante nos pH 7,0 e 8,0 e superior ao pH 6,0. Já o isolado CHZ113 obteve crescimento máximo semelhante nos pH 6,0 e 7,0, mas superior a eles quando cultivado em pH 8,0 (Figura 14 e Apêndice E e G).

Figura 14 - Crescimento máximo das bactérias quitinolíticas cultivadas em meio mineral contendo 1,2% de quitina quando expostas a diferentes valores de pH

FONTE: CARDOZO, 2012

As melhores condições de crescimento identificadas para cada isolado entre as variáveis analisadas podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Resumo das condições selecionadas para o cultivo de cada bactéria quitinolítica

Isolado	Condições de Crescimento							
	Temperatura		Concentração de Quitina			pH		
	28 °C	37 °C	0,5%	1,2%	2,5%	6,0	7,0	8,0
CH101	+	-	-	-	+	-	+	-
CH147	+	-	-	-	+	+	-	-
CH149	+	-	-	-	+	-	-	+
CH150	+	-	-	-	+	-	-	+
CH151	+	-	-	-	+	+	-	-
CH125	+	-	-	+	-	-	-	+
CH129	+	-	-	-	+	+	-	-
CH141	+	-	-	-	+	-	-	+
CH286	+	-	-	-	+	-	-	+
CHZ52	+	-	-	-	+	+	-	-
CHZ113	+	-	-	+	-	-	-	+
CHZ306	+	-	-	+	-	-	-	+

Legenda: [+] Condição ideal; [-] condição desfavorável

FONTE: CARDOZO, 2012

5.3 Avaliação da degradação de quitina por bactérias quitinolíticas

5.3.1 Determinação da concentração bacteriana

As concentrações bacterianas foram determinadas em cada período durante a avaliação da degradação de quitina (Apêndice H). Observou-se através dos resultados obtidos que cinco

isolados (CH101, CH147, CH149, CH286 e CHZ52) apresentaram maiores concentrações entre 10^9 e 10^{10} UFC, quatro isolados (CH125, CH141, CHZ113 e CHZ306) apresentaram maiores concentrações entre 10^8 e 10^9 UFC e três isolados (CH150, CH151 e CH129) apresentaram maiores concentrações entre 10^7 e 10^8 UFC (Figura 15). Assim como verificado na avaliação das condições de cultivo, com exceção do isolado CH149 que atingiu concentrações máximas a 48 horas, todos os isolados atingiram o crescimento máximo a 24 horas.

Figura 15 - Concentração máxima de bactérias quitinolíticas durante avaliação da degradação de quitina

FONTE: CARDOZO, 2012

5.3.2 Avaliação do pH

Três perfis de variação de pH (Tabela 3) foram observados ao longo das 96 horas de cultivo. No primeiro perfil, 9 isolados (CH125, CH141, CH147, CH149, CH150, CH151, CH286, CHZ52 e CHZ306) apresentaram uma redução dos valores de pH até as 24 horas e um aumento até as 96 horas de cultivo. No segundo perfil, 2 isolados (CH101 e CHZ113) apresentaram uma redução dos valores de pH até as 48 horas e um aumento até as 96 horas de cultivo. Já no terceiro perfil, o isolado CH129 apresentou uma redução dos valores de pH até as 96 horas de cultivo.

Tabela 3 - Variação do pH no cultivo de bactérias quitinolíticas de acordo ao tempo de incubação

Isolados	Tempo				
	T=0	T=24	T=48	T=72	T=96
CH101	7,01	6,67	6,59	6,87	7,03
CH147	6,02	5,90	6,16	6,31	6,32
CH149	7,96	7,02	7,15	7,33	7,34
CH150	7,98	6,83	7,28	7,32	7,31
CH151	6,03	5,51	6,33	6,44	6,51
CH125	7,95	7,09	7,18	7,22	7,23
CH129	6,03	5,46	5,24	5,19	5,05
CH141	7,97	6,83	7,13	7,17	7,29
CH286	8,04	6,94	6,95	7,13	7,15
CHZ52	5,97	5,69	6,34	6,63	6,67
CHZ113	7,96	6,98	6,91	7,15	7,34
CHZ306	8,03	7,01	7,13	7,30	7,33

FONTE: CARDOZO, 2012

5.3.3 Avaliação da degradação de quitina em meio sólido

A degradação de quitina em meio sólido foi observada pela formação de halos de hidrólise após 96 horas de cultivo (Figura 16). Os maiores halos de hidrólise observados foram obtidos pelos isolados CHZ52 e CHZ306 seguidos do CH125, CH129 e CH286. Os menores halos de hidrólise foram observados no cultivo dos CH101 e CH141. Os resultados obtidos na avaliação da degradação de quitina em meio sólido podem ser observados na Figura 17 e Apêndice I.

Figura 16 - Halos de hidrólise de quitina produzidos por bactérias quitinolíticas.

FONTE: CARDOZO, 2012

Figura 17 - Diâmetros dos halos de hidrólise de quitina produzidos pelas bactérias quitinolíticas em ágar mineral contendo 1,2% de quitina

FONTE: CARDOZO, 2012

5.3.4 Avaliação da degradação de quitina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A degradação de quitina foi avaliada através da quantificação dos monômeros (*N*-acetil-glicosamina), dímeros (quitobiose) e trímeros (quitotriose) liberados durante 96 horas de cultivo. Os tempos de retenção identificados com as soluções padrões de *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc), quitobiose (GlcNAc)₂ e quitotriose (GlcNAc)₃ corresponderam a 8,6 min, 6,7 min e 5,7 min, respectivamente.

As maiores concentrações de GlcNAc detectadas foram observadas no cultivo do isolado CH129 (Figura 18). A liberação de GlcNAc por esse isolado foi extremamente superior aos outros isolados em 24 (206 mg), 48 (628 mg), 72 (655 mg) e 96 (621 mg) horas de cultivo. Os isolados CH151 e CH286 foram aqueles que após o isolado CH129, apresentaram a segunda e terceira maior concentração de GlcNAc, sendo 2,72 mg e 2,17 mg, respectivamente. No entanto, esses isolados apresentaram essas concentrações somente em um período do cultivo (CH151 em 24 horas e CH286 em 48 horas), sendo que nos demais, a concentração de GlcNAc variou de 0 a 0,13 mg. Com exceção dos isolados CH101 e CHZ52 que não foi detectado a liberação de GlcNAc, todos os outros isolados também apresentaram variações em relação ao tempo e a concentração de GlcNAc liberada. No entanto, a maior concentração de GlcNAc liberada não ultrapassou 0,23 mg. As concentrações de GlcNAc detectadas por HPLC podem ser observadas no Apêndice J.

Quanto a liberação de quitobiose, foram observadas concentrações baixas durante o

cultivo dos isolados (Apêndice J). As maiores concentrações de quitobiase foram detectadas no cultivo dos isolados CH147 às 24 horas, CH151 às 96 horas e CHZ52 as 48, 72 e 96 horas. No entanto, as concentrações de quitobiase liberadas por esses isolados foram de apenas 2 µg.

A liberação de quitotriose também foi baixa durante o cultivo dos isolados (Apêndice J). As maiores concentrações de quitobiase foram detectadas no cultivo do isolados CH149 às 24, 48 e 72 horas e corresponderam a 3 µg.

Figura 18 - Cromatogramas exibindo a concentração de *N*-acetil-glicosamina no cultivo do isolado CH129 de acordo ao tempo de incubação

5.3.5 Avaliação da degradação de quitina pela quantificação de açúcares solúveis totais (AST)

A maior concentração de AST foi observada durante o cultivo do isolado CH129. Esse isolado apresentou os maiores valores de AST com 24 (288,8 mg), 48 (711,3 mg), 72 (749,3 mg) e 96 (717,4 mg) de cultivo. No cultivo dos demais isolados foram detectados valores que variaram até 30 mg. Entre esses, o cultivo dos isolados CH125 (48 e 96 horas), CH149 (72 horas) e CHZ52 (24 horas) foram aqueles em que maiores concentrações de AST foram detectadas, sendo 18,1 e 26,4 (CH125), 29,1 (CH149) e 20,3 mg (CHZ52). Os resultados obtidos na avaliação da degradação de quitina através da quantificação de AST podem ser observados no Apêndice K. Com exceção do CH129, os demais resultados obtidos durante o cultivo dos isolados podem ser observados na Figura 19.

Figura 19 - Concentrações de AST liberados no cultivo das bactérias quitinolíticas de acordo ao tempo de incubação

Nota: Os resultados referentes ao isolado CH129 foram retirados da figura acima por serem os únicos maiores que 30 mg. (ver Apêndice K)

FONTE: CARDOZO, 2012

5.3.6 Avaliação da atividade de enzimas quitinolíticas

Observou-se que todas as bactérias foram capazes de expressar as três quitinases avaliadas (*N*-acetil-glicosaminidases, quitobiosidases e endoquitinases). No entanto, nem todas as bactérias mostraram o mesmo nível de atividade ao longo das 96 horas de cultivo. O

isolado CHZ306, foi o único que apresentou atividade superior a $0,01 \text{ U.mL}^{-1}$ para as três enzimas avaliadas em 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo.

Avaliando cada enzima individualmente, observou-se que seis isolados (CH125, CH149, CH150, CH286, CHZ52 e CHZ306) apresentaram atividade de *N*-acetil-glicosaminidases entre $0,01$ e $0,06 \text{ U.mL}^{-1}$, sendo que os demais isolados apresentaram atividade inferior $0,01 \text{ U.mL}^{-1}$. A atividade de *N*-acetil-glicosaminidases variou entre os isolados e oscilou ao longo do período de cultivo, mas de maneira geral, as maiores atividades foram observadas em 48 e 96 horas de cultivo. Os isolados CH150 ($0,0530 \text{ U.mL}^{-1}$), CHZ306 ($0,04020 \text{ U.mL}^{-1}$) e CH149 ($0,03903 \text{ U.mL}^{-1}$) foram aqueles que apresentaram maiores atividades de *N*-acetil-glicosaminidases. No entanto, em diferentes períodos, sendo CHZ306 com 48 horas e CH150 e CH149 com 96 horas de cultivo.

A atividade das enzimas *N*-acetil-glicosaminidases dos 12 isolados pode ser observada na Figura 20 e Apêndice L.

Figura 20 - Atividades de *N*-acetil-glicosaminidases das bactérias quitinolíticas de acordo ao tempo de incubação

FONTE: CARDOZO, 2012

A atividade de quitobiosidases foi maior após 24 horas de incubação e foi observado que sete isolados (CH125, CH141, CH149, CH150, CH286, CHZ113 e CHZ306) apresentaram atividade de quitobiosidases entre $0,01$ e $0,05 \text{ U.mL}^{-1}$, sendo que os demais isolados apresentaram atividade inferior $0,01 \text{ U.mL}^{-1}$. A atividade de quitobiosidases também variou entre os isolados, mas de maneira geral, as maiores atividades foram observadas nas

primeiras 24 horas e se manteve estável entre 0,01 e 0,03 U.mL⁻¹ em pelos menos seis dos isolados (CH125, CH149, CH150, CH286, e CHZ306). Os isolados CH149 (0,0478 U.mL⁻¹), CH150 (0,0335 U.mL⁻¹), CHZ306 (0,0331 U.mL⁻¹) e CH125 (0,0312 U.mL⁻¹) foram aqueles que apresentaram maiores atividades de quitobiosidases, sendo todos com 24 horas de cultivo.

A atividade das enzimas quitobiosidases dos 12 isolados pode ser observada na Figura 21 e Apêndice M.

Figura 21 - Atividades de quitobiosidases das bactérias quitinolíticas de acordo ao tempo de incubação

FONTE: CARDOZO, 2012

A atividade de endoquitinases diminuiu a partir das 24 horas iniciais de cultivo e foi observado que seis isolados (CH125, CH141, CH149, CH150, CH286 e CHZ306) apresentaram atividade de endoquitinases entre 0,01 e 0,045 U.mL⁻¹, sendo que os demais isolados apresentaram atividade inferior 0,01 U.mL⁻¹. A atividade de endoquitinases também variou entre os isolados, mas de maneira geral, as maiores atividades foram observadas nas primeiras 24 horas, ocorrendo posteriormente um declínio até as 96 horas de cultivo de pelos menos seis dos isolados (CH125, CH141, CH149, CH150, CH286 e CHZ306). Os isolados CH149 (0,04017 U.mL⁻¹), CHZ306 (0,03211 U.mL⁻¹), CH125 (0,02848 U.mL⁻¹) e CH150 (0,02281 U.mL⁻¹) foram aqueles que apresentaram maiores atividades de endoquitinases, sendo todos com 24 horas de cultivo.

A atividade das enzimas endoquitinases dos 12 isolados pode ser observada na Figura 22 e Apêndice N.

Figura 22 - Atividades de endoquitinases das bactérias quitinolíticas de acordo ao tempo de incubação

FONTE: CARDOZO, 2012

5.4 Avaliação do perfil enzimático de bactérias quitinolíticas

5.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Perfis enzimáticos de cada isolado quitinolítico foram obtidos por SDS-PAGE durante 96 horas de cultivo em meio mineral com quitina. A comparação dos perfis enzimáticos obtidos de cada isolado com SDS-PAGE foi realizada através do programa *Bionumerics*. Cinco dendrogramas foram contruídos, sendo quatro comparando os perfis enzimáticos em relação aos tempos avaliados (24, 48, 72 e 96 horas) (Figura 23) e um comparando todos os perfis enzimáticos (Figura 24). Analisando os dendrogramas contruídos para comparação do perfil enzimático dos isolados em relação ao tempo, observou-se que os isolados não apresentaram o mesmo perfil de bandas em nenhum dos tempos avaliados. A maior similaridade (80%) encontrada foi observada entre os isolados CH141 e CH150 no período de 24 horas de incubação. Através do dendrograma contruído para comparação de todos os perfis enzimáticos, observou-se que os isolados apresentaram diferentes perfis e que com exceção dos isolados CH141 e CH286, os perfis de cada isolado em diferentes tempos estão mais relacionados entre eles mesmos.

Figura 23 - Dendrogramas construídos com os perfis enzimáticos dos isolados obtidos através da técnica de SDS-PAGE de acordo ao tempo de incubação

Legenda: [A]: 24 horas; [B]: 48 horas; [C]: 72 horas; [D]: 96 horas.

FONTE: CARDOZO, 2012

Figura 24 - Dendrogramas construídos com os perfis enzimáticos dos isolados obtidos através da técnica de SDS-PAGE durante 96 horas de cultivo

FONTE: CARDOZO, 2012

Analisando cada gel individualmente, observou-se que todos os isolados apresentaram bandas entre 30 e 130 kDa e que todos apresentaram pelo menos quatro bandas entre 50 e 100 kDa. Observou-se também que com exceção do CH129, todos os isolados apresentaram duas bandas entre 100 e 130 kDa. No entanto, as intensidades nessas bandas foram diferentes entre os períodos verificados. Alguns isolados (CH101, CH125, CH141, CH149, CH150, CH286, CHZ113 e CHZ306) apresentaram maiores intensidades nessas bandas com 24 horas e alguns apresentaram ausência (CH147 às 24 horas e CH141 às 96 horas) ou intensidades extremamente baixas (CH101 e CH286 às 48 horas) em um dos períodos verificados.

Em relação a banda de aproximadamente 130 kDa, observou-se que alguns isolados (CH125, CH149, CH150 e CH306) apresentaram diminuições nas intensidades ou ausência de bandas ao longo do cultivo. Quanto a banda de aproximadamente 100 kDa, observou-se que vários isolados (CH101, CH125, CH149, CH150, CH151, CHZ113 e CHZ306) mantiveram concentrações semelhantes ou simplesmente apresentaram essa banda ao longo das 96 horas de cultivo.

Em relação ao número de bandas presentes nos géis, observou-se que os isolados apresentaram diferentes números em relação aos tempos verificados. Os maiores números de bandas observadas ao longo do cultivo foram 12 (CH125, CH286 e CHZ306), 11 (CH149, CH150 e CH151), 10 (CHZ52), 9 (CHZ113), 8 (CH101, CH147 e CHZ306) e 7 (CH129).

Os resultados citados acima podem ser observados através da Figura 25.

Figura 25 - Perfil enzimático do isolado CH101 de acordo ao tempo de incubação

Legenda: [1]: Padrão de peso molecular; [2]: Perfil com 24 horas; [3]: Perfil com 48 horas; [4]: Perfil com 72 horas; [5]: Perfil com 96 horas.

FONTE: CARDOZO, 2012

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 Caracterização molecular de bactérias quitinolíticas pertencentes ao gênero *Aeromonas*

A similaridade (>99%) observada entre as bactérias quitinolíticas estudadas com quatro espécies diferentes do gênero *Aeromonas* (*Aeromonas punctata*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas aquariorum* e *Aeromonas caviae*) a partir do gene 16S rRNA está relacionada à heterogeneidade limitada desse gene entre as espécies de *Aeromonas* (MORANDI et al., 2005). De acordo com Martin Carnahan e Joseph (2005), espécies do gênero *Aeromonas* apresentam alta similaridade entre elas (97,8-100%) e análises baseadas nas sequências do gene 16S rRNA mostram menos de 1% de variabilidade entre as espécies, o que pode definir claramente um isolado de *Aeromonas* somente até o nível de gênero (MARTIN CARNAHAN; JOSEPH, 2005). Dessa maneira, buscamos uma definição desses isolados em nível de espécie avaliando adicionalmente três *housekeeping* genes (*recA*, *rpoB* e *rpoD*).

Analizando individualmente as sequências de cada *housekeeping* gene, observou-se que os isolados podem representar duas espécies (*Aeromonas punctata* e *Aeromonas caviae*) segundo o gene *recA* e *rpoD* e outras duas espécies (*Aeromonas punctata* e *Aeromonas hydrophila*) segundo o gene *rpoB*. *Aeromonas punctata* e *Aeromonas caviae* observadas pelas sequências do gene *recA* e *rpoD* são consideradas como sinônimo uma da outra, embora *A. punctata* anteceda a publicação e validação de *A. caviae* por nome quase 30 anos (MARTIN CARNAHAN; JOSEPH, 2005). Esse fato está relacionado à classificação de *Aeromonas punctata*, ou seja, tanto *A. punctata* como *A. caviae* compartilham a mesma cepa tipo (ATCC 15468^T). Este problema surgiu porque a cepa neótipo de *A. punctata* foi relatada como NCMB 74 (equivalente a ATCC 23309). Além disso, NCMB 74 é também a cepa tipo de *A. eucrenophila*.

Os nossos resultados mostram que o uso da técnica *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) não está sendo apropriada em *Aeromonas* pelas dificuldades encontradas para identificação de espécie. Além disso, vários autores relatam a existência de muitas controvérsias na classificação de *Aeromonas* (POPOFF, 1984; POPOFF et al., 1981; HICKMAN-BRENNER et al., 1987; KUIJPER et al., 1989; CARNAHAN et al., 1991; JANDA; ABBOTT, 2010).

A taxonomia do gênero *Aeromonas* não ficou clara por muitos anos, sendo que até 1980 somente quatro espécies estavam descritas na literatura (POPOFF, 1984). Extensos

estudos de hibridação DNA-DNA realizados posteriormente (CARNAHAN et al., 1991; HICKMAN-BRENNER et al., 1987; KUIJPER et al., 1989; POPOFF et al., 1981) tiveram como resultado o reconhecimento de 14 grupos de homologia. Já em 2010, 24 espécies de *Aeromonas* estavam presentes na literatura incluindo a proposta de uma espécie denominada *Aeromonas tecta* (JANDA; ABBOTT, 2010). No entanto, por mais que a taxonomia de *Aeromonas* tenha assistido a um grande número de espécies propostas nas últimas três décadas, ainda existem discussões pendentes na nomenclatura (JANDA; ABBOTT, 2010).

Uma das discussões está associada à classificação das espécies desse gênero devido ao número limitado de cepas que foram analisadas para fins taxonômicos (JANDA; ABBOTT, 2010; JOSEPH; CARNAHAN, 1994), ou seja, de sete espécies de *Aeromonas* recentemente publicadas, apenas três delas (*A. molluscorum*, *A. aquariorum* e *A. tecta*) foram propostas com base na análise de mais de três cepas. Isso mostra um nítido contraste com espécies bem definidas, tais como *A. media*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. jandaei*, *A. trota*, e *A. bestiarum*, onde os números comparáveis são muito mais elevados (entre 7 e 15 cepas) (JANDA; ABBOTT, 2010). Christensen e colaboradores (2001) questionaram a validade de descrever uma nova espécie com base em uma única estirpe. Eles sugerem que um mínimo de cinco linhagens bem caracterizadas tanto fenotipicamente quanto genotipicamente devem ser o padrão mínimo para uma proposta de espécie e ter incluída a sequência completa do gene 16S rRNA. No entanto, controvérsias taxonômicas também tem sido atribuídas a ausência de marcadores fenotípicos suficientes para diferenciação das espécies de *Aeromonas* (NHUNG et al., 2007) e o gene 16S rRNA fornece uma identificação limitada até o nível de gênero (MARTÍNEZ-MURCIA, 1999; MORANDI et al., 2005).

O estudo de diferentes genes tem sido satisfatório para classificação bacteriana, mas a utilização de cepas padrão em substituição as sequências disponibilizadas em bancos de dados seria outra boa alternativa à identificação. No entanto, um dos caminhos mais promissores para resolver muitos problemas e questões na nomenclatura e taxonomia em *Aeromonas* é a utilização do sequenciamento total do genoma e a análise de microarray (NASH et al., 2006; SESHADRI et al., 2006).

6.2 Determinação das condições de cultivo para avaliação da degradação de quitina por bactérias quitinolíticas do gênero *Aeromonas*

6.2.1 Metodologia de cultivo e contagem de bactérias quitinolíticas

O crescimento bacteriano pode ser medido a partir de métodos diretos e indiretos de

contagem (Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater - APHA, 1995). Um dos métodos indiretos de contagem é a turbidez, o qual representa um método rápido e muito útil para estimar o número de células em uma amostra. No entanto, quando trabalhamos com quitina, encontramos a dificuldade dela corresponder a um polissacarídeo insolúvel em água ou qualquer outro solvente comumente utilizado (CAMPANA-FILHO et al, 2007), o que impossibilita a utilização de medidas espectroscópicas em suas análises.

Dentre as metodologias utilizadas para contagem de células viáveis, podemos citar a contagem de bactérias em placa, a qual pode ser realizada através da semeadura da amostra em profundidade (*pour plate*) ou superfície (*spread plate*) (Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater - APHA, 1995). O método de *pour plate* apresentou dificuldade para visualização dos halos de hidrólise de quitina nos testes iniciais devido à sobreposição das colônias de bactérias quitinolíticas no ágar. Devido a essa desvantagem, o método de *spread plate* foi selecionado para o estudo, possibilitando assim, uma melhor contagem das colônias bacterianas e visualização dos halos de hidrólise de quitina. Além disso, o método *spread plate* possibilitou a utilização de pérolas de vidro durante a semeadura, o que facilitou a distribuição dos inóculos em placas e tornaram o processo mais ágil que com a utilização da alça de Drigalski.

6.2.2 Avaliação das variáveis selecionadas

A temperatura de 28 °C na avaliação das condições de cultivo foi selecionada por ser aquela utilizada por Souza (2009) durante o isolamento no estudo da diversidade de bactérias quitinolíticas no litoral do estado de São Paulo e a temperatura de 37 °C foi selecionada por ser aquela em que a maioria das bactérias se desenvolvem e por ser muito utilizada na microbiologia clássica.

Através dos resultados obtidos, observou-se que todos os isolados apresentaram maiores concentrações a 28 °C quando comparado à temperatura de 37 °C. Até mesmo os isolados (CH147, CH149, CH129, CHZ52 e CH286) que atingiram crescimento semelhante nas duas temperaturas nas primeiras 24 horas foram sensíveis à temperatura de 37 °C nas próximas 72 horas de cultivo e mostraram uma redução do número de células viáveis. Já alguns os isolados (CH101, CH150, CH141, CHZ113 e CHZ306), mostraram maior sensibilidade à temperatura de 37°C desde as primeiras 24 horas de cultivo.

Brzezinska e Donderski (2001) avaliaram a influência da temperatura na atividade quitinolítica de bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas do lago Jeziorak na Polônia. Nesse

estudo, a temperatura de 20 °C, a qual foi utilizada para isolamento das bactérias foi aquela que apresentou atividade quitinolítica superior às outras analisadas (10 °C, 30 °C e 40 °C) por *Aeromonas* sp. Resultados similares foram encontrados no presente estudo, uma vez que todos os isolados cresceram melhor a 28 °C, temperatura a qual foi realizado o isolamento inicial realizado por Souza, (2009).

A capacidade desses isolados atingirem melhor crescimento a 28 °C é uma boa alternativa para a produção industrial de quitinases em larga escala, pois tratamentos que envolvem resfriamento ou aquecimento na indústria requerem custos elevados e sistemas cada vez mais específicos (SARKAR et al., 2010). Assim, de acordo com os resultados obtidos, a temperatura de 28 °C foi selecionada para avaliação da concentração de quitina e pH.

A concentração de quitina coloidal foi selecionada buscando a concentração mínima e máxima utilizada nos trabalhos encontrados na literatura (0,5% e 2,5%) (BRZEZINSKA; DONDESKI, 2001; DONDESKI; TRZEBIATOWSKA, 2000; NIELSEN et al., 2011; URIA et al., 2006; ZHOU, 1999). Já a concentração de 1,2% de quitina, foi incluída no estudo por ser aquela utilizada no isolamento das bactérias quitinolíticas por Souza (2009).

Observou-se através dos resultados obtidos que nove isolados (CH101, CH147, CH149, CH150, CH151, CH129, CH141, CH286 e CHZ52) apresentaram maiores concentrações quando cultivados a 2,5% de quitina e três isolados (CH125, CHZ113 e CHZ306) atingiram maiores concentrações a 1,2% de quitina. Esses isolados atingiram maiores concentrações em diferentes períodos de incubação. No entanto, avaliando o crescimento dos isolados em diferentes concentrações de quitina e independente do período de incubação, foi observado que o crescimento máximo de alguns isolados (CH101, CH141, CH147 e CHZ52) foi relativamente proporcional a quantidade de substrato presente no meio, ou seja, esses isolados atingiram maiores concentrações na medida em que foram expostos a maiores concentrações de quitina. Resultados semelhantes foram observados por Donderski e Trzebiatowska (2000) e Brzezinska e Donderski (2001) verificando atividade quitinolítica de bactérias planctônicas e do gênero *Aeromonas*, respectivamente. Eles observaram que a atividade quitinolítica sofreu aumento na medida em que a concentração de quitina coloidal era maior. No entanto, no caso de alguns dos nossos isolados (CH129, CH147, CH149 e CH151), o crescimento máximo a 0,5% de quitina foi relativamente semelhante ao crescimento máximo dos isolados expostos a pelo menos uma das outras concentrações de cultivo verificadas.

Os microrganismos podem responder de diferentes maneiras às condições físicas e químicas do ambiente, entretanto, quando trabalhamos com isolados ambientais torna-se

ainda mais difícil fornecer as condições específicas para o seu desenvolvimento e avaliar seu comportamento frente a essas condições. Geralmente é esperado que quanto maior a concentração de substrato, maior o crescimento bacteriano. No entanto, certos fatores podem atuar limitando seu crescimento. A presença e ação de quitooligossacarídeos parcialmente desacetilados no cultivo, por exemplo, é um desses fatores e tem sido discutido entre os pesquisadores (EIJSSINK et al., 2000; FUKAMIZO et al., 2001; TEWS et al., 1997; VAN AALTEN et al., 2001). Esses quitooligossacarídeos podem atuar como inibidores de quitinases, o que poderia influenciar no crescimento bacteriano. Donderski e Trzebiatowska (2000) observaram também que o acúmulo de produtos intermediários, provenientes da decomposição de quitina, podem atuar como inibidores da síntese de quitinases. Por exemplo, *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) é utilizada pelas bactérias como fonte de carbono e nitrogênio, mas por outro lado, grandes quantidades de *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) podem inibir a produção de outras quitinases envolvidas na degradação de quitina e dificultar o crescimento bacteriano em cultivos no qual somente a quitina está presente como fonte de carbono.

Com os resultados obtidos, comparando o crescimento dos isolados em diferentes concentrações de quitina, foi possível observar o comportamento desses isolados em relação a disponibilidade de substrato. Sendo assim, duas concentrações de quitina (1,2% e 2,5%) foram selecionadas para avaliação da variável pH.

Os valores de pH utilizados na avaliação das condições de cultivo foram selecionados buscando trabalhar com um potencial hidrogeniônico acima e abaixo de 7,0, o qual foi utilizado por Souza (2009) no isolamento das bactérias quitinolíticas.

Avaliando o crescimento dos isolados em diferentes valores de pH, observou-se que os isolados ficaram divididos em três grupos de pH quanto ao crescimento máximo que atingiram. No entanto, todos os isolados foram capazes de manter o crescimento nas três faixas de pH. No caso no isolado CH129, o cultivo em pH 6,0 possibilitou que atingisse um crescimento máximo superior a uma escala logarítmica comparado ao pH 7,0. Takagi e colaboradores (2006) avaliaram a influência do pH no crescimento celular e na produção de polissacarídeo por *H. influenzae* tipo b (PSb). Eles observaram que a introdução do controle do pH foi o grande diferencial na melhora da produtividade de PSb e que essa melhora deve-se a três importantes condições de cultivo, ou seja, da composição do meio de cultura, da aeração e do controle do pH. Por outro lado, Donderski e Trzebiatowska (2000) citaram que o crescimento de bactérias quitinolíticas e degradação de quitina dependem de muitos fatores ambientais, sendo os mais importantes o pH, temperatura, concentração de quitina e tempo de

incubação, respectivamente.

Através das variáveis aqui analisadas, selecionamos as condições em que os isolados atingiram o maior crescimento, possibilitando assim, fornecer a eles melhores condições para o crescimento e estudo da degradação de quitina e expressão de quitinases.

6.3 Avaliação da degradação de quitina por bactérias quitinolíticas do gênero *Aeromonas*

6.3.1 Avaliação da degradação de quitina

A visualização dos halos de hidrólise, produzidos pela atividade enzimática de bactérias quitinolíticas em ágar mineral contendo quitina como única fonte de carbono, permite avaliar rapidamente a degradação de quitina por um grande número de bactérias. Esse método é prático, de fácil visualização e indica o potencial de produção de quitinases por bactérias quitinolíticas (AKUTSU et al., 1993; AVELIZAPA et al., 1999; CODY et al., 1989; HOWARD et al., 2003). Além disso, estudos realizados por Keyhani e Roseman (1999) mostraram que as quitinases bacterianas são enzimas expressas somente quando a quitina é a única fonte de carbono presente no meio de cultura, pois quando cultivaram *Vibrio furnisii* em meios de cultura contendo outras fontes de carbono e quitina, os halos de hidrólise não foram observados.

Através dos resultados obtidos após 96 horas de cultivo a 28 °C em ágar mineral contendo 1,2% de quitina, observou-se que três isolados (CH125, CHZ52 e CHZ306) apresentaram halos maiores que 5,10 mm. Esses resultados foram melhores que os encontrados em *Bacillus alvei* onde um halo com raio de 3,8 mm foi observado somente após 8 dias de cultivo. Donderski e Trzebiatowska (2000) em um estudo com diferentes bactérias isoladas do Lago Jeziorak na Polônia observaram um halo de 6,0 mm no cultivo de *Erwinia stewartii* produzido somente após 144 horas de cultivo. Halos de 6,0 mm e 7,0 mm produzidos por *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas sp.*, respectivamente, foram observados somente após 192 horas de cultivo (DONDESKI; TRZEBIATOWSKA, 2000). Outros trabalhos avaliando o potencial de degradação de quitina em meio sólido por bactérias quitinolíticas podem ser encontrados na literatura (AKUTSU et al., 1993; AVELIZAPA et al., 1999; CODY et al., 1989; HOWARD et al., 2003; MURTHY; BLEAKLEY, 2012). No entanto, esses trabalhos utilizam meios de cultivo com diferentes composições, diferentes concentrações de quitina e diferentes metodologias de preparação de quitina coloidal, o que dificulta a comparação do potencial desses isolados.

Outra metodologia utilizada para avaliar a degradação de quitina foi a quantificação dos monômeros (*N*-acetil-glicosamina), dímeros (quitobiose) e trímeros (quitotriose) de açúcares liberados durante o período de 96 horas de cultivo. A quantificação desses produtos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), (BASSLER et al., 1991; JAMIALAHMADI et al., 2011; JUNG et al., 2007; KOGA et al., 1998; UEDA et al., 2003). De acordo com os resultados obtidos, foi observado que com exceção do cultivo do isolado CH129 que apresentou as maiores concentrações de *N*-acetil-glicosamina nos períodos verificados, todos os outros cultivos apresentaram ausência, concentrações baixas ou extremamente baixas dos monômeros, dímeros e trímeros liberados na hidrólise da quitina. Esse resultado mostra-se um tanto obscuro, uma vez que as atividades de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases foram observadas durante todos os períodos de cultivo. Entretanto, podemos justificar os resultados obtidos nesse estudo através do processo de degradação de quitina e do sistema de transporte de quitoooligossacarídeos por *Vibrio furnissi* (KEYHANI; ROSEMAN, 1999; KEYHANI et al., 2000). O processo de degradação de quitina envolve uma série de passos enzimáticos (KEYHANI; ROSEMAN, 1999), os quais envolvem quitinases extracelulares e intracelulares (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998; HARMAN et al., 1993; KEYHANI; ROSEMAN, 1999; LI; ROSEMAN, 2004; SAHAI; MANOCHA, 1993). Segundo Keyhani et al. (2000), existem porinas específicas denominadas quitoporinas que realizam o transporte de oligossacarídeos maiores [(GlcNAc)_{n=2-6}] para o espaço periplasmático e o transporte de GlcNAc e outros açúcares é feito por porinas comuns. Em seguida, pelo menos duas hidrolases específicas para oligossacarídeos de quitina presentes no espaço periplasmático degradam os oligossacarídeos em monossacarídeos (GlcNAc) e dissacarídeos (GlcNAc)₂, os quais atravessam a membrana interna da bactéria através de sistemas de transporte distintos e finalmente chegam ao citoplasma (BASSLER et al., 1991; BOUMA; ROSEMAN, 1996; KEYHANI et al., 1996; KEYHANI; ROSEMAN, 1997; LI; ROSEMAN, 2004). No citoplasma, os dissacarídeos (GlcNAc)₂ são primeiramente hidrolisados a monossacarídeos (GlcNAc) e em seguida as moléculas de GlcNAc são convertidas a acetato, amônia e frutose 6-fosfato (COMB; ROSEMAN, 1958).

O processo de degradação de quitina e o sistema de transporte de quitoooligossacarídeos por *V. furnissi* (KEYHANI; ROSEMAN, 1999; KEYHANI et al., 2000) pode ser aplicado aos nossos resultados, já que maiores concentrações de *N*-acetil-glicosamina, quitobiose e quitotriose não foram detectadas possivelmente por terem sido metabolizadas e/ou estarem presentes no espaço periplasmático bacteriano. Além disso, segundo BASSLER et al. (1991), GlcNAc, (GlcNAc)₂ e (GlcNAc)₃ são consumidos rapidamente pelas células. Já em relação ao

isolado CH129, possivelmente seu mecanismo de degradação diferencia-se dos outros isolados e concentra-se principalmente na liberação de GlcNAc a partir da molécula de quitina, a qual é convertida para frutose 6-fosfato pela via glicolítica e que pode ser transportada para o interior das células por meio de porinas comuns.

Os resultados obtidos na avaliação da degradação de quitina através da quantificação de açúcares solúveis totais (AST) liberados durante o cultivo também podem ser justificados pelo processo de degradação por *V. furnissi* (KEYHANI; ROSEMAN, 1999). Através desse ensaio realizado pelo método de Antrona, foi possível verificar a liberação de açúcares solúveis totais em todos os períodos (24, 48, 72 e 96 horas) de cultivo por todos os isolados. Alguns isolados produziram quantidades elevadas de AST em todos ou pelo menos um período verificado. Esses resultados mostram que as bactérias atuaram na degradação de quitina durante as 96 horas de cultivo. No entanto, a quantificação dos produtos de hidrólise de quitina por cromatografia líquida de alta eficiência e dos açúcares solúveis totais não são apropriadas para avaliação desse processo, pois não permitem monitorar a degradação devido à insolubilidade da quitina. Dessa maneira, não foi possível determinar a concentração de quitina inicial e durante o cultivo para avaliar a degradação no período de 96 horas de incubação e selecionar o isolado com maior capacidade.

6.3.2 Avaliação da atividade de enzimas quitinolíticas

As atividades das enzimas *N*-acetil-glicosaminidase, quitobiosidase e endoquitinase foram avaliadas utilizando o kit *Chitinase Assay* (Sigma-Aldrich). A avaliação por esse kit é baseada na hidrólise enzimática de análogos sintéticos de *N*-acetil-glicosamina ou oligossacarídeos de quitina ligados ao *p*-nitrofenol. A hidrólise desses análogos pelas enzimas libera *p*-nitrofenol (4-nitrofenol), o qual após ionização em pH básico, pode ser colorimetricamente medido a 405 nm. O uso de *p*-nitrofenol ligado a substratos para quitinases tem sido descrito e utilizado por vários autores, facilitando a detecção da atividade quitinolítica em culturas fúngicas e bacterianas, em macrófagos lisados e preparações de enzimas purificadas (BASSLER et al., 1991; HOWARD, 2003; KEYHANI; ROSEMAN, 1999; SOUZA, 2009; SUGINTA, 2007; SVITIL et al., 1997; TRONSMO; HARMAN, 1993).

De maneira geral, observou-se através da avaliação da atividade das enzimas quitinolíticas que todas as bactérias foram capazes de expressar as três quitinases avaliadas. No entanto, os isolados mostraram diferentes níveis de atividade para essas enzimas ao longo das 96 horas de cultivo. As maiores atividades de *N*-acetil-glicosaminidase foram observadas em 96 horas de incubação. Já as maiores atividades das enzimas quitobiosidases e

endoquitinases foram observadas em 24 horas de incubação.

Em nossos resultados foi esperado encontrar relações entre a avaliação da atividade enzimática e a degradação de quitina por esses isolados. No entanto, essa relação não foi observada, visto que somente três enzimas foram avaliadas e outras quitinases diferentes das avaliadas podem ter sido expressas durante a degradação de quitina. Estudos mostram, por exemplo, seis quitinases expressas por *B. circulans* WL-12 (WATANABE et al., 1990), oito quitinases em *Aeromonas* spp. (UEDA e ARAI, 1992; UEDA et al., 1995), seis genes em *V. harveyi* que codificam pelo menos dez quitinases dependendo do tipo de quitina utilizada no cultivo (SVITIL et al., 1997), quatro quitinases por *Alteromonas* spp. O-7 (ORIKOSHI et al., 2005) e quatro quitinases codificadas apenas pelo gene *chi1* em *Aeromonas caviae* (MUHAMMAD et al., 2010).

Os resultados obtidos por esses autores mostram que o processo de degradação de quitina é realizado com ação conjunta de várias quitinases que exercem diferentes funções. Além disso, a cascata de degradação de quitina é extremamente regulada e envolve várias transduções de sinais com múltiplas proteínas extracelulares, periplasmáticas, de membrana e citoplasmáticas até a conversão de quitina a acetato, amônia e frutose 6-fosfato (BASSLER et al., 1991a,b; COMB; ROSEMAN, 1958; LI; ROSEMAN, 2004; YU et al., 1993). Dessa maneira, torna-se difícil a tentativa de realizar qualquer relação entre os resultados obtidos no presente estudo. No entanto, esses resultados fornecem uma visão geral do processo de degradação de quitina e da expressão de *N*-acetil-glicosaminidases, quitobiosidases e endoquitinases por esses isolados durante 96 horas de cultivo.

6.3.3 Avaliação do pH

Através da avaliação do pH ao longo de 96 horas de incubação, foi observado que o cultivo das bactérias quitinolíticas apresentou variações durante as 96 horas de cultivo. No entanto, a comparação dessas variações de pH com a atividade quitinolítica dos isolados é um tanto difícil de ser realizada, uma vez que o pH sofreu alterações devido a vários fatores durante o cultivo. Esses fatores incluem os produtos excretados pelas bactérias, os produtos liberados através da lise celular bacteriana, as proteínas presentes no meio e a própria degradação de quitina. Dessa maneira, torna-se difícil afirmar o pH no qual as enzimas apresentam maior atividade. Para responder esse tipo de questão, deveríamos avaliar o extrato enzimático ou as proteínas individualmente para afirmar qual pH seria ideal para a atividade enzimática.

A influência do pH na atividade quitinolítica de *Aeromonas* sp., *Aeromonas*

salmonicida e *Aeromonas hydrophila* foi verificada por Brzezinska e Donderski (2001). Os autores observaram que todos os isolados apresentaram maior atividade quitinolítica em pH 6,0. Donderski e Trzebiatowska (2000) também verificaram a influência do pH na atividade quitinolítica de isolados de diferentes espécies e a maioria dos isolados, incluindo *Aeromonas* spp., apresentaram maior atividade quitinolítica em pH 6,0. Já *Bacillus firmus* e *Bacillus pumilus* apresentaram maior atividade em pH 5,0. Verificando a atividade quitinolítica em *Arthrobacter* sp., Morrissey et al. (1976) observaram maior atividade em pH 4,9, enquanto Monreal e Reese (1969) observaram maior atividade quitinolítica por *Serratia marcescens* em pH 6,4.

Apesar desses estudos terem verificado o pH no qual as quitinases apresentaram maiores atividades quitinolíticas, certos cuidados devem ser tomados em experimentos envolvendo a utilização de quitinases, pois por mais que a atividade quitinolítica seja maior em um determinado pH, quitinases com funções específicas podem necessitar de diferentes pH em relação às outras para produzir maiores atividades. Keyhani e Roseman (1999), por exemplo, observaram que uma *N*-acetil-glicosaminidase é altamente específica para oligossacarídeos de quitina, e mais interessante, que muda a sua especificidade para um deles (dissacarídeo) com a mudança do pH. Assim, essa enzima hidrolisa (GlcNAc)_{n=2-6}, em pH 5,8, mas a atividade com (GlcNAc)_{n=3-6} aumenta muitas vezes com o aumento do pH, enquanto que a atividade com (GlcNAc)₂ diminui. Com o pH da água do mar (8,0-8,3), a atividade enzimática com dissacarídeo foi praticamente indetectável. A observação realizada por Keyhani e Roseman (1999) também pode ser aplicada aos resultados obtidos com o cultivo dos isolados CH129 e CH151 no presente estudo, os quais indicaram maiores liberações de *N*-acetil-glicosamina detectadas por HPLC exatamente nos períodos (CH129 às 24, 48, 72 e 96 horas e CH151 às 24 horas) em que o pH foi aproximadamente 6,0.

As maiores liberações de *N*-acetil-glicosamina por esses isolados em pH abaixo de 6,0 indicam maiores atividades de *N*-acetil-glicosaminidase. No entanto, essas indicações não mostram relação com os resultados encontrados na avaliação da atividade quitinolítica, onde CH129 e CH151 apresentaram uma das menores atividades para *N*-acetil-glicosaminidases. Isso pode ter ocorrido devido a utilização de análogos sintéticos de *N*-acetil-glicosamina ligados ao *p*-nitrofenol para determinação da atividade enzimática, ou seja, por mais que esses tipos de análogos tenham sido amplamente utilizados e facilitado muito as triagens envolvidas na atividade quitinolítica (BASSLER et al., 1991; HOWARD, 2003; KEYHANI; ROSEMAN, 1999; SUGINTA, 2007; SVITIL et al., 1997; TRONSMO; HARMAN, 1993), as informações adquiridas com a utilização de análogos podem levar a conclusões equivocadas

se a atividade enzimática não for medida utilizando os substratos naturais (KEYHANI; ROSEMAN, 1999).

Variações na atividade de muitas hidrolases quando medidas com substratos análogos sintéticos podem mostrar diferenças tão maiores quanto 1000 vezes em comparação com substratos naturais (KEYHANI; ROSEMAN, 1999). Um exemplo disso foi observado com *V. furnissii*, o qual possui pelo menos quatro enzimas que não pertencem ao sistema clássico de classificação das quitinases (CHITLARU; ROSEMAN 1996; KEYHANI; ROSEMAN, 1996a,b). A enzima designada chitodextrinase, por exemplo, apresenta uma sequência de aminoácidos com homologia a um grande número de quitinases, mas não é um quitinase. Essa enzima é essencialmente incapaz de hidrolisar quitina, mas hidrolisa oligossacarídeos de quitina (GlcNAc)_{n>3}. Embora esta enzima seja capaz de hidrolisar substratos artificiais de *p*-nitrofenol-(GlcNAc)_{n=2}, ela não demonstra qualquer atividade para dissacarídeos [(GlcNAc)₂] ou trissacarídeos [(GlcNAc)₃] naturais. Além disso, outros fatores como as diferenças no pH e temperatura ótima entre substratos artificiais e naturais tem sido relatadas por quitinases isoladas de *Streptomyces* (ROBBINS et al., 1988) e *Bacillus* (TAKAYANAGI et al., 1991).

6.3.4 Avaliação do crescimento bacteriano

A avaliação do crescimento bacteriano foi realizada com objetivo de relacionar as concentrações celulares (UFC.mL⁻¹) com os níveis de atividade quitinolítica e a degradação de quitina durante 96 horas de cultivo das bactérias quitinolíticas. Através dos resultados obtidos, observou-se que o isolado CH150 foi um dos que apresentaram menores concentrações (10⁷ UFC.mL⁻¹). No entanto, foi o isolado que apresentou maior atividade para *N*-acetil-glicosaminidase e um dos que apresentaram maiores atividades para quitobiosidases e endoquitinases. O CH149 foi um dos isolados que apresentaram maiores concentrações e também um dos que apresentaram maiores atividades para as três enzimas avaliadas. O isolado CHZ306 apresentou crescimento com concentração intermediária e também foi aquele que apresentou maior atividade para as enzimas *N*-acetil-glicosaminidase, quitobiosidases e endoquitinases. Já o isolado CH129 foi um dos que apresentaram menores concentrações e menores atividades para as enzimas avaliadas. No entanto, o cultivo desse isolado foi aquele no qual maiores concentrações de *N*-acetil-glicosamina e AST foram encontrados.

De acordo com essas observações, e considerando que as bactérias quitinolíticas estudadas foram isoladas de ambientes marinhos, podemos dizer que cada isolado possui sua particularidade, seja na tolerância as condições ambientais, na degradação de quitina ou nos

níveis de quitinases expressos. Além disso, esses isolados comportam-se de diferentes maneiras e não necessariamente aqueles que apresentam maior crescimento são aqueles que irão apresentar maior atividade quitinolítica ou degradação de quitina.

6.4 Avaliação do perfil enzimático de bactérias quitinolíticas

A avaliação do perfil enzimático foi realizada com objetivo de conhecer a expressão e a quantidade de enzimas expressas por cada isolado quando cultivados em caldo mineral com quitina como única fonte de carbono ao longo das 96 horas de incubação.

Através dos resultados obtidos, observou-se que os perfis enzimáticos diferem entre os isolados e que os perfis de cada isolado observados em 24, 48, 72 e 96 horas também diferem entre eles ao longo do cultivo, mas esses perfis estão mais relacionados entre eles mesmos do que com os perfis de outros isolados, ou seja, cada isolado apresenta seu próprio perfil enzimático. No entanto, três semelhanças foram observadas entre os perfis desses isolados: 1) Os géis de todos os isolados apresentaram bandas entre 30 e 130 kDa; 2) Com exceção do CH129, todos os isolados apresentaram duas bandas entre 100 e 130 kDa; 3) Todos os isolados apresentaram pelo menos quatro bandas entre 50 e 100 kDa.

Várias diferenças envolvendo o tamanho e a quantidade de quitinases expressas entre diferentes espécies podem ser observadas na literatura. Sitrit et al. (1995) observaram uma quitinase de *Aeromonas caviae* de 94 kDa, Ueda et al. (2000) observaram a expressão de uma *N*-acetil-gliconaminidase por *Aeromonas* sp. 10S-24 de 70 kDa, Itoi et al. (2007) identificaram uma endoquitinase de 110 kD produzida por *Vibrio proteolyticus* e Lan e colaboradores (2004) observaram a expressão de uma exoquitinase (90 kDa) e três endoquitinases (60, 70 e 90 kDa) por *Aeromonas hydrophila* Suwa-9. Em outro estudo, Muhammad et al. (2010) observaram quatro quitinases (92, 82, 70, and 55 kDa) expressas por *Aeromonas caviae* cultivadas em meio mínimo com extrato de levedura e quitina coloidal. Já Svitil et al. (1997) avaliaram a produção de quitinases por *Vibrio harveyi* isolado do ambiente marinho em diferentes formas de quitina. Eles observaram a expressão total de 10 quitinases (42, 45, 47, 67, 77, 91, 98, 107, 125 e 130 kDa). No entanto, diferentes quitinases foram expressas de acordo com o tipo de quitina utilizada. No cultivo com quitina coloidal os autores observaram a expressão de cinco quitinases (42, 77, 91, 98 e 130 kDa).

Comparando os resultados obtidos no presente estudo com os encontrados na literatura, observamos como citado anteriormente, que a degradação de quitina é realizada com ação conjunta de várias quitinases que exercem diferentes funções. Além disso, que os isolados possuem a capacidade de expressar inúmeras quitinases, mas que expressam

diferentes enzimas de acordo com sua necessidade.

Keyhani e Roseman (1999) analisando a degradação de quitina por *Vibrio furnissi* a partir do momento em que a carapaça do zooplâncton é liberada no processo de ecdise até a captação dos produtos da hidrólise da quitina observaram que esse processo envolve no mínimo quatro etapas: a percepção da presença por colisão ao acaso ou quimiotaxia; ligação ao substrato; expressão de enzimas necessárias para degradação e captação e utilização dos produtos de hidrólise. Consequentemente, é provável que esse processo, extremamente regulado de degradação de quitina, envolva entre 50 a 100 genes (ROSEMAN, 2003) e que a presença de quitobiose [(GlcNAc)₂] parece ser a via mais importante para degradação de quitina. Segundo Keyhani e Roseman (1999), uma hipótese para esse processo seria a secreção de quitinases extracelulares pelas bactérias. Essas enzimas distanciam-se das células e algumas começam a digerir a quitina, formando um gradiente de quitobiose. Esse gradiente atrai as células através do mecanismo de quimiotaxia e finalmente as células encontram o substrato de quitina a ser degradado. Os autores propõem ainda, que quitinases extracelulares pode ter duas funções: fornecer o nutriente [(GlcNAc)₂] e criar um caminho quimiotático para a nova fonte de quitina (KEYHANI e ROSEMAN, 1999).

7 CONCLUSÕES

- Os isolados podem representar duas espécies do gênero *Aeromonas* pelo sequenciamento dos *housekeeping genes* utilizados e identificações baseadas no gene 16S rRNA não são apropriadas para a caracterização desses isolados em nível de espécie.
- O método de *spread plate* associado à utilização de pérolas de vidro ofereceu uma boa alternativa para contagem de bactérias quitinolíticas viáveis.
- Os halos de hidrólise de quitina, produzidos pelas bactérias quitinolíticas, não estão relacionados à atividade enzimática ou aos produtos de hidrólise de quitina quantificados.
- A quantificação dos produtos de hidrólise de quitina por cromatografia líquida de alta eficiência e dos açúcares solúveis totais não são apropriadas para avaliação desse processo, pois não permitem monitorar a degradação devido à insolubilidade da quitina.
- Todas as bactérias foram capazes de expressar as três quitinases avaliadas. No entanto, maiores atividades foram observadas em 24 horas de incubação para as enzimas quitobiosidases e endoquitinases e em 96 horas para *N*-acetil-glicosaminidases.
- Os perfis enzimáticos diferem entre os isolados e os perfis de cada isolado também diferem entre eles ao longo do cultivo, mostrando a diversidade de enzimas existente entre eles e envolvidas no processo de degradação de quitina.
- Os isolados comportaram-se de diferentes maneiras em relação às condições de cultivo e não necessariamente aqueles que apresentaram maior crescimento foram aqueles que apresentaram maior atividade quitinolítica.

REFERÊNCIAS

- ABRAM, A. P.; HIGUERA, I. Generalidades. In: Abram, A. P. **Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**. 1. ed. Lima, PE: Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial, 2004. Cap. 1, p. 25-65.
- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2035, 2004.
- AGULLÓ, E.; PENICHE, C.; TAPIA, C.; HERAS, Á.; ROMÁN, J. S.; ARGÜLLES, W.; GOYCOOLEA, F.; MAYORGA, A.; NAKAMATSU, J.; ABRAM, A. P. Química de la quitina y el quitosano. In: Abram, A. P. **Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**. 1. ed. Lima, PE: Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial, 2004. Cap. 2, p. 75-95.
- AJIT, N. S.; VERMA, R.; SHANMUGAM, V. Extracellular chitinases of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causing carnation wilt. **Current Microbiology**, v. 52, n. 4, 310-316, 2006.
- AKUTSU, K.; HIRATA, A.; YAMAMOTO, M.; HIRAYAE, K.; OKUYAMA, S.; HIBI, T. Growth inhibition of *Botrytis* spp. by *Serratia marcescens* B2 isolated from *Tomato Phylloplane*. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, v. 59, p. 18-25, 1993.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ORGANIZATION. Microbiological examination. In: **Microbiological examination of water and wastewater**. 19^a. ed. Washington D. C.: APHA, AWWA, WEF., 1995, p. 9-34.
- ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueleto de camarões oriundos da indústria pesqueira Paraibana**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.
- ARAKI, Y.; ITO, E. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 55, p. 71-78, 1975.
- AUNPAD, R.; PANBANGRED, W. Cloning and characterization of the constitutively expressed chitinase C gene from a marine bacterium, *Salinivibrio costicola* strain 5SM-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 529-536, 2003.
- AVELIZAPA, L. I. R.; CAMARILLO, R. C.; GUERRERO, M. I.; VAZQUEZ, R. R.; IBARRA, J. E. Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 299-308, 1999.
- BASSLER, B. L.; YU, C.; LEE, C. Y. C.; ROSEMAN, S. Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 24276-24286, 1991.
- BASSLER, B. L.; GIBBONS, P. J.; YU, C.; ROSEMAN, S. Chitin utilization by marine bacteria. Chemotaxis to chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n.36, p. 24268-24275, 1991a.

BASSLER, B. L.; YU, C.; LEE, Y. C.; ROSEMAN, S. Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 36, p. 24276-24286, 1991b.

BLACKWELL, J.; PARKER, K. D.; RUDALL, K. M. Chitin fibers of the diatoms *Thalassiosira fluviatilis* and *Cyclotella cryptica*. **Journal of Molecular Biology**, v. 28, 383-385, 1967.

BLACKWELL, J.; WEIH, M. A. The structure of chitin-protein complexes. In: ZIKAKIS, J.P. **Chitin, chitosan and related enzymes**. Orlando: Academic Press, 1984. p. 257-272.

BOGUSLAWSKI, S.; BUNZEIT, M.; KNORR, D.; Effects of chitosan treatment on clarity and microbial counts of apple juice. **Zeitschrift für Lebensmittel-Technologie und Verfahrenstechnik**, p. 41-44, 1990.

BOOT, R. G.; BLOMMAART, E. F. C.; SWART, E.; VAN DER VLUGT; K. G., BIJL; N., MOE, C.; PLACE, A.; AERTS, J. M. F. G. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 9, p. 6770-6778, 2001.

BOUMA, C. L.; ROSEMAN, S. Sugar transport by the marine chitinolytic bacterium *Vibrio furnissi*. molecular cloning and analysis of the glucose and *N*-acetylglucosamine permeases. **The Journal of Biological Chemistry**, 271, n. 52, p. 33457-33467, 1996.

BOYD, J. M.; DACANAY, A.; KNCKELEL, L. C.; TOUHAMI, A.; BROWNL, L. L.; JERICHO, M. H.; JOHNSON, S. C.; REITH, M. Contribution of type IV pili to the virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Infection and Immunity**, v. 76, p. 1445-1455, 2008.

BRZEZINSKA, M; DONDESKI, W. Occurrence and activity of the chitinolytic bacteria of *Aeromonas* genus. **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 10, n. 1, p. 27-31, 2001.

BRZEZINSKA, M. S.; LALKE-PORCZYK, E.; DONDESKI, W.; WALCZAK, M. Occurrence and activity of microorganisms in shrimp waste. **Current Microbiology**, v. 57, p. 580-587, 2008.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LARVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α e β quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p 644-650, 2007.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNANRD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active enZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**. v. 37, p. 233-238, 2009.

CARDOZO, F. A. **Avaliação da atividade quitinolítica por bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas do ecossistema marinho**. 111f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CARLSTROM, D. The crystal structure of alpha-chitin (poly-*N*-Acetyl-D-glucosamine). **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v.3, n.5, p. 669-683, 1957.

CARNAHAN, A. M.; CHAKRABORTY, T.; FANNING, G. R.; VERMA, D.; ALI, A.; JANDA, J. M.; JOSEPH, S. W. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 1206-1210, 1991.

CHANG, Y. C.; WANG, J. Y.; SELVAM, A.; KAO, S. C.; YANG, S. S.; SHIH, D. Y. Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. from suspect food samples in northern Taiwan. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 10, p. 2094-2099, 2008.

CHEN, J. K.; SHEN, C. R.; LIU, C. L. *N*-acetylglucosamine: production and applications. **Marine drugs**, v.8, p. 2493-2516, 2010.

CHITLARU, E.; ROSEMAN, S. Molecular cloning and characterization of a novel L-*N*-acetyl-D-glucosaminidase from *Vibrio furnissii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 33433-33439, 1996.

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M.; FREDERIKSEN, W.; MUTTERS, R.; OLSEN, J.E. Is characterization of a single isolate sufficient for validation of a new genus or species? Proposal to modify recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 revision). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** p. 2221-2225, 2001.

CHUN, J. **Computer assisted classification and identification of Actinomycetes**. 1995. 444 f. Ph. D. Thesis - University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, England, 1995.

CODY, R. M. Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. **Current Microbiology**, v. 19, p. 201-205, 1989.

CODY, R.M.; DAVIS, N.D.; LIN, J.; SHAW, D. Screening microorganisms for chitin hydrolysis and production of ethanol from amino sugars. **Biomass**, v. 21, n. 4, p. 285-295, 1990.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 270-277, 1998.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

COMB, D. G.; ROSEMAN, S. Glucosamine metabolism. IV glucosamine-6-phosphate deaminase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 232, p. 807-827, 1958.

COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Carbohydrate-active enzymes: An integrated database approach. In: GILBERT, H. J.; DAVIES, G.; HENRISSAT, B.; SVENSSON, B. **Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering**. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1999, p. 3-12.

DACANAY, A.; BOYD, J. M.; FAST, M. D.; KNICKLE, L. C.; REITH, M. E. *Aeromonas salmonicida* type I pilus system contributes to host colonization but not invasion. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, p. 199-206, 2010.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; GURINDER SINGH HOONDAL. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 773-782, 2006.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, p. 853-859, 1995.

DEANE, E. E.; WHIPPS, J. M.; LYNCH, J. M.; PEBERDY, J. F. The purification and characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 101-110, 1998.

DELEZUK, J. A. M. **Desacetilação de Beta-quitina assistida por ultrasom de alta intensidade: estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da temperatura da reação**. 2009. 33 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

DIXIT, R.; ARAKANE, Y.; SPECHT, C. A.; RICHARD, C.; KRAMER, K. J.; BEEMAN, R. W.; MUTHUKRISNAN, S. Domain organization and phylogenetic analysis of proteins from the chitin deacetylase gene family of *Tribolium castaneum* and three other species of insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 440-451, 2008.

DONDERSKI, W.; TRZEBIATOWSKA, M. Influence of physical and chemical factors on the activity of chitinases produced by planktonic bacteria Isolated from Jeziorak Lake. **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 9, n. 2, p. 77-82, 2000.

DONNELLY, L. E.; BARNES, P. J. Acidic mammalian chitinase - a potential target for asthma therapy. **Trends Pharmacological Science**, v. 25, 509-511, 2004.

DUMONTET, S.; KROVACEK, K.; BALODA, B.; GROTTOLI, R.; PASQUALE, V.; VANUCCI, S. Ecological relationship between *Aeromonas* and *Vibrio* spp. And planktonic copepods in the coastal marine environment in southern Italy. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 245-254, 1996.

EIJSSINK, V. G. H.; PETER-KATALINIC, J.; PETER, M. G. Libraries of chito-oligosaccharides of mixed acetylation patterns and their interactions with chitinases. **Advances in Chitin Science**, v. 4, p. 545-552, 2000.

EINBU, A. **Characterisation of chitin and a study of its acid-catalysed hydrolysis**. Thesis (Ph. D in Biotechnology) - Department of Biotechnology. Norwegian University of Science and Technology, Noruega, 2007.

FRÄNDBERG, M.; SCHNÜRER, J. Evaluation of a chromogenic chito-oligosaccharide analogue, p-nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobiose, for the measurement of the chitinolytic activity of bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 76, n.3, p. 259-263, 1994.

FREITAS, A. C.; RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; GOMES, A. M. P.; DUARTE, A. C. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. **Biotechnological Advances**, 2012. In press.

FUKAMIZO, T.; OHKAWA, T.; IKEDA, Y.; GOTO, S. Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1205, n. 2, p.183-188, 1994.

FUKAMIZO, T.; SASAKI, C.; SCHELP, E.; BORTONE, K.; ROBERTUS, J. D. Kinetic properties of chitinase-1 from the fungal pathogen *Coccidioides immitis*. **Biochemistry**, v. 40, 2448-2454, 2001.

FURUKAWA, K.; MATSUMURA, F.; TONOMURA, K. *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degrading polychlorinated biphenyls. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 543-548, 1978.

GARCIA, E. Assessment of endo-1,4-beta-D-glucanase activity by a rapid colorimetric assay using disodium 2,2'' biconchinate. **Journal of Food Biochemistry**, v. 17, 135-145, 1993.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Diversity of clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine River, Paris, France. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1256-1261, 2011.

GOODAY, G. W. The ecology of chitin degradation. **Advances in Microbial Ecology**, v. 11, p. 387-430. 1990.

GOODAY, G. W. Diversity of roles of chitinases in nature. In: ZAKARIA, M. B.; WAN MUDA, W. M.; ABDULLAH, M. P. **Chitin and Chitosan**. Malaysia: Penerbit Universiti Kebangsaan, 1995, p. 191-202.

HACKMAN, R. H.; GOLDBERG, M. Studies on Chitin. VI. Nature of Alpha- and Beta-Chitins. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.18, n. 4, p. 935-941, 1965.

HAN, Y.; YANG, B.; ZHANG, F.; MIAO, X.; LI, Z. Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 Associated with south China sea sponge *Craniella australiensis*. **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 132-140, 2009.

HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, v. 83, n. 3, p. 313-318, 1993.

HEIM, H. K.; OESTMANN, A.; THIELE, H.; SEWING, K. H. Incorporation of *N*-Acetyl-[14C]D-glucosamine and [3H]L-Leucine by isolated pig gastric mucosal cells. **Digestion**, v. 44, p. 26-35, 1989.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **The Biochemical Journal**, v. 280, p. 309-316, 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequences similarities. **The Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788, 1993.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 316, p. 695-696, 1996.

HERTH, W.; MULISH, M.; ZUGENMAIER, P. Comparison of chitin fibril structure and assembly in three unicellular organisms. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. **Chitin in Nature and Technology**. New York: Plenum Press, 1986, p. 107-120.

HICKMAN-BRENNER, F. W.; MACDONALD, K. L.; STEIGERWALT, A. G.; FANNING, G. R.; BRENNER, D. J.; FARMER, J. J.; *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 900-906, 1987.

HIRAGA, K.; SHOU, L.; KITAZAWA, M.; TAKAHASHI, S.; SHIMADA, M.; SATO, R.; ODA, K. Isolation and characterization of chitinase from a flake chitin degrading marine bacterium, *Aeromonas hydrophila* H-2330. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, p. 174-176, 1997.

HIRANO, S.; NAGAO, N. An improved method for the preparation of colloidal chitin by using methanesulfonic Acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n. 8, 2111-2112, 1988.

HIRONO, I.; YAMASHITA, M.; AOKI, T. Molecular cloning of chitinase genes from *Vibrio anguillarum* and *V. parahaemolyticus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 6, p. 1175-1178, 1998.

HOROWITZ, S. T.; ROSEMAN, S.; BLUMENTHAL, H. J. The preparation of glucosamine oligosaccharides. I. Separation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 5046-5049, 1957.

HOWARD, M. B.; EKBORG, N. A.; WEINER, R. M.; HUTCHESON, S. W. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 627-635, 2003.

HUYS, G.; COOPMAN, R.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K. Highresolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 572-580, 1996.

ILLUM, L. Chitosan and its use as pharmaceutical excipient, **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 9, p. 1326-1331, 1998.

ITOI, S.; KANOMATA, Y.; KOYAMA, Y. ; KADOKURA, K.; UCHIDA, S.; NISHIO, T.; OKU, T.; SUGITA, H. Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain N°. 442. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1774, n. 9, p. 1099-1107, 2007.

JAMIALAHMADI, K.; BEHRAVAN, J.; FATHI NAJAFI, M.; TABATABAEI YAZDI, M.; SHAHVERDI, A. R.; FARAMARZI, M. A. Enzymatic production of *N*-acetyl-D-glucosamine from chitin using crude enzyme preparation of *Aeromonas* sp. PTCC1691. **Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 292-297, 2011.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. The Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Review**, v. 23, p. 35-73, 2010.

JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. **Chitin in nature and technology**. New York: Plenum Press, p. 107-120, 1986.

JEUNIAUX, C.; VOSS-FOUCART, M.F. Chitin biomass and production in the marine environment. **Biochem Syst Ecol** 19:347–356, 1991.

JOHNSTONE, J. Conditions of life in the sea. Cambridge: University Press, p. 332, 1908.

JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 315-343, 1994.

JUAREZ-JIMENEZ, B.; RODELAS, B.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; CROGNALÉ, S.; GALLO, A. M.; PESCIAROLI, C.; FENICE, M. Production of chitinolytic enzymes by a strain (BM17) of *Paenibacillus pabuli* isolated from crab shells samples collected in the east sector of central Tyrrhenian Sea. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 27-31, 2008.

JUNG, W. J.; SOULEIMANOV, A.; PARK, R. D.; SMITH, D. L. Enzymatic production of N-acetyl chitooligosaccharides by crude enzyme derived from *Paenibacillus illioisensis* KJA-424. **Carbohydrate Polymers**, v.67, p. 256-259, 2007.

KARLSSON, M.; STENLID, J. Evolution of family 18 glycoside hydrolases: diversity, domain structures and phylogenetic relationships. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, p.208-223, 2009.

KELECOM A. Chemistry of marine natural products: yesterday, today and tomorrow. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, p. 249-263, 1999.

KEYHANI, N. O; WANG, L.; LEE, Y. C.; ROSEMAN, S. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissi*. Characterization of an *N,N'*- Diacetyl-chitobiose transport system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33409-33413, 1996.

KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. The chitin catabolic in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic chitodextrinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33414-33424, 1996a.

KEYHANI N. O.; ROSEMAN, S. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic β -N-acetylglucosaminidase. **The Journal of Biological Chemistry**, 271, n. 52, p. 33425-33432, 1996b.

KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, N,N'-diacetylchitobiose, by expressing the cel operon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, U. S. A.**, v. 94, n. 26, p. 14367-14371, 1997.

KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1473, p. 108-122, 1999.

KEYHANI, N. O.; LI, X.; ROSEMAN, S. Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Identification and molecular cloning of a chitoporin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 33068-33076, 2000.

KIM S. K.; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, 357-368, 2005.

KIM, H. M.; HONG, S. H.; YOO, S. J.; BAEK, K. S.; JEON, Y. J.; CHOUNG, S. Y. Differential effects of chitooligosaccharides on serum cytokine levels in aged subjects. **Journal of Medicine Food**. v. 9, p. 427-430, 2006.

KIRCHNER, M. Microbial colonization of copepod body surfaces and chitin degradation in the sea. **Helgoland Marine Research**, v. 49, p. 201-212, 1995.

KLOKKEVOLD, P. R.; VANDERMARK, L.; KENNEY, E. B.; BERNARD, G. W. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) *in vitro*. **Journal of Periodontology**, v. 67, p. 1170-1175, 1996.

KOBATA, A.; GINSBURG, V. Oligosaccharides of human milk: I. Isolation and characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 130, p. 509-513, 1969.

KOBAYASHI, H.; UTSUNOMIYA, H.; YAMANAKA, H.; SEI, Y.; KATUNAMA, N.; OKAMOTO, K.; TSUGE, H. Structural basis for the kexin-like serine protease from *Aeromonas sobria* as sepsis-causing factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 27655-27663, 2009.

KOGA, D.; YOSHIOKA, T.; ARAKANE, Y. HPLC analysis of anomeric formation and cleavage pattern by chitinolytic enzyme. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 8, p. 1643-1646, 1998.

KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition Research**, v. 18, n. 6, p. 1091-1101, 1998.

KONSTANTINIDIS, K.; TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 504-509, 2007.

KOPING-HOGGARD, M.; MELNIKOVA, Y. S.; VARUM, K. M.; LINDMAN, B.; ARTURSSON, P. Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Gene Medicine**, v. 5, p. 130-141, 2003.

KOPING-HOGGARD, M.; VARUM, K. M.; ISSA, M.; DANIELSEN, S.; CHRISTENSEN, B. E.; STOKKE, B. T.; ARTURSSON, P. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. **Gene Therapy**, v. 11, p. 1441-1452, 2004.

KORCZAK, B.; CHRISTENSEN, H.; EMLER, S.; FREY, J.; KUHNERT, P. Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1393-1399, 2004.

KUIJPER, E. J.; STEIGERWALT, A. G.; SCHOENMAKERS, B. S. C. I. M., PEETERS, M. F. ZANEN, H. C. BRENNER, D. J. Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 132-138, 1989.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1921-1971, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAN, X.; OZAWA, N.; NISHIWAKI, N.; KODAIRA, R.; OKAZAKI, M.; SHIMOSAKA, M. Purification, cloning, and sequence analysis of beta-*N*-acetylglucosaminidase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.68, p. 1082-1090, 2004.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; OODFELLOW, M. In: **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. England: John Wiley & Sons, Chichester, 1991, p. 115-163.

LEE, H. W.; PARK, Y. S.; CHOI, J. W.; YI, S. Y.; SHIN, W. S. Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 1100-1103, 2003.

LEVIN, R. M.; KRIEGER, N. N.; WINZLER, R. J. Glucosamine and acetylglucosamine tolerance in man. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 58, p. 927-932, 1961.

Li, J.; NI, X. D.; LIU, Y. J.; LU, C. P. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 823-830, 2011.

LI, X.; ROSEMAN, S. The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, U.S.A.**, v. 101, n. 2, p. 627-631, 2004.

LI, X.; WANG, L. X.; WANG, X.; ROSEMAN, S. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio cholerae*: Characterization of a unique chitin oligosaccharide deacetylase. **Glycobiology**, v. 17, p. 1377-1387, 2007.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. Purificação de Enzimas. In: LIMA, U.A. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001, v. 3, cap 17, p. 115-163.

LINDSAY, G. J. H.; GOODAY, G. W. Chitinolytic enzymes and the bacterial microflora in the digestive tract of cod, *Gadus morhua*. **Journal of Fish Biology**, v. 26, n. 3, p. 255-265, 1990.

LIU, Y.; LI, Z.; LIU, G.; JIA, J.; LI, S.; YU, C. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of *N*-Acetylglucosamine concentration in human plasma. **Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 862, p. 150-154, 2008.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSEL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, U. S. A.**, v. 95, n. 6, p.3140-3145, 1998.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, p. 938-942, 1990.

MARTIN CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. Genus I. *Aeromonas* Stanier. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York, NY: Springer, 2005, v. 2, part B, p. 557-578.

MARTINO, M. E.; FASOLATO, L.; MONTEMURRO, F.; ROSTEGHIN, M.; MANFRIN, A.; PATAMELLO, T.; NOVELLI, E.; CARDAZZO, B. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4986-5000, 2011.

MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas* DNA hybridization Group 11 and *Aeromonas* Group 501. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1403-1408, 1999.

MASS, W.A.; MASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies, **Polymer International**, v. 47, n.2, p. 89-144, 1998.

MASSON, J. Y.; DENIS, F.; BRZEZINSKI, R. Primary sequence of the chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174 and comparison with other endoglycosidases. **Gene**, v. 140, p. 103-107, 1994.

MCCOY, A. J.; KOIZUMI, Y.; TOMA, C.; HIGA, N.; DIXIT, V.; TANIGUCHI, S.; TSCHOPP, J.; SUZUKI, T. Cytotoxins of the human pathogen *Aeromonas hydrophila* trigger, via the NLRP3 inflammasome, caspase-1 activation in macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 2797-2803, 2010.

MERZENDORFER, H.; ZIMMICH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 4393-4412, 2003.

MILLER, J. B.; BULL, S.; MILLER, J.; MCVEAGH, P. The oligosaccharide composition of human milk: Temporal and individual variations in monosaccharide components. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 19, p. 371-376, 1994.

MONREAL, J.; REESE, E. T. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, p. 689-696, 1969.

MORANDI, A.; ZHAXYBAYEVA, O.; GORGATEN, J. P.; GRAF, J. Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 6561-6564, 2005.

MORI, T.; ICHIKAWA, W.; KITA, Y.; TETSUKA, Y. Method for fermentative production of *N*-acetyl-D-glucosamine by microorganism. **Patent**, n. 20100055746, 2010.

MORRISSEY, R. F.; DUGAN, E. P.; KOTHS, J. S. Chitinase production by an *Arthrobacter* sp. lysing cells of *Fusarium roseum*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 8, 23-28, 1976.

MUHAMMAD, A. M.; YINGBAO, G.; QUNCHUAN, Z.; FENG, W.; XIANG, X.; FENGPING, W. *Aeromonas caviae* CB101 contains four chitinases encoded by a single gene *chi1*. **Molecular Biotechnology**, v. 44, p. 213-220, 2010.

MURTHY, N. K. S.; BLEAKLEY, B. H. Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 10, n. 2, 2012.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin**. Oxford, U. K.: Pergamon Press. 1977. p. 309.

NAKAKUKI, T. **Oligosaccharides: production, properties and applications**. Gordon and Breach, Switzerland, v.3, n.2, p. 144-157, 1993.

NAM, K. S.; KIM, M. K.; SHON, Y. H. Inhibition of proinflammatory cytokine-induced invasiveness of HT-29 cells by chitosan oligosaccharide. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 2042-2045, 2007.

NASH, J. H. E.; FINDLAY, W. A.; LUEBBERT, C. C.; MYKYTCZUK, O. L.; FOOTE, S. J.; TABOADA, E. N.; CARRILLO, C. D.; BOYD, J. M.; COLQUHOUN, D. J.; REITH, M. E. Comparative genomics profiling of clinical isolates of *Aeromonas salmonicida* using DNA microarrays. **BMC Genomics**, v. 7, n. 43, 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/7/43>>. Acesso em: 27 Maio 2012.

NELSON, N. A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-80, 1944.

NHUNG, P. H.; HATA, H.; OHKUSU, K.; NODA, M.; SHAH, M. M.; GOTO, K.; EZAKI, T. Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1232-1237, 2007.

NIELSEN, J. S.; LARSEN, M. H.; LILLEBAEK, E. M. S.; BERGHOLZ, T. M.; CHRISTINASEN, M. H. G.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M.; KALLIPOLITIS, B. H. A small RNA controls expression of the chitinase *chiA* in *Listeria monocytogenes*. **Plos one**, v. 6, n. 4, 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0019019>>. Acesso em: 27 Maio 2012.

NOMENCLATURE COMMITTEE OF INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Enzyme nomenclature**. San Diego, CA: Academic Press, 1992. 862 p.

NUBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n.19, p. 5636-5643, 1996.

OHNO, T.; ARMAND, S.; HATA, T.; NIKAIDOU, N.; HENRISSAT, B.; MITSUTOMI, M.; WATANABE, T. A Modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5065-5070, 1996.

OLIVEIRA, E. N.; EL GUEDDARI, N. E.; MOERSCHBACHER, B. M.; PETER, M. G.; FRANCO, T. T. Growth of phytopathogenic fungi in the presence of partially acetylated chitoooligosaccharides. **Mycopathologia**, v. 166, p. 163-174, 2008.

OPPENHEIM, A. B.; CHET, I. Cloned chitinase in fungal plant: Pathogen control strategies. **Trends Biotechnology**, v. 10, p. 392-394, 1992.

ORIKOSHI, H.; NAKAYAMA, S.; MIYAMOTO, K.; HANATO, C.; YASUDA, M.; INAMORI, Y.; TSUJIBO, H. Roles of four chitinases (*chiA*, *chiB*, *chiC*, and *chiD*) in the chitin degradation system of marine bacterium *Alteromonas* sp. strain O-7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1811-1815, 2005.

OVERDIJK, B.; VAN STEIJN, G. J.; ODDS, F. C. Chitinase levels in guinea pig blood are increased after systemic infection with *Aspergillus fumigatus*. **Glycobiology**, v. 6, n. 6, p. 627-634, 1996

OVERDIJK, B.; VAN STEIJN, G. J.; ODDS, F. C. Distribution of chitinase in guinea pig tissues and increases in levels of this enzyme after systemic infection with *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**, v. 145, p. 259-269, 1999.

PAN, C. H.; RIM, S. L.; KIM, S. I. Expression of two cDNAs encoding class I chitinases of rice in *Escherichia coli*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, p. 1346-1348, 1996.

POPOFF, M. Genus III: *Aeromonas*. In: HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, v. 1, p. 545-548.

POPOFF, M. Y.; COYNAULT, C.; KIREDJIAN, M.; LEMELIN, M. Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. **Current Microbiology**, v. 5, p. 109-114, 1981.

POULICEK, M.; JEAUNIAUX, C. Chitin biomass in marine sediments. In: SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. **Chitin and Chitosan**. London: Elsevier Applied Science, 1988, p. 151-155.

PRAKASH, O.; VERMA, M.; SHARMA, P.; KUMAR, M.; KUMARI, K.; SINGH, A.; KUMARI, H.; JIT, GUPTA, S. K.; KHANNA, M.; LAL, R. Polyphasic approach of bacterial classification: an overview of recent advances. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 98-108, 2007.

RAMÍREZ, M. G.; AVELIZAPA, L. I. R.; AVELIZAPA, N. G. R.; CAMARILLO, R. C. Colloidal chitin stained with Remazol Blue R®, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 2, p. 213-219, 2004.

RATANAVARAPORN, J.; KANOKPANONT, S.; TABATA, Y.; DAMRONGSAKKUL, S. Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitoooligosaccharide films. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 873-878, 2009.

RHOADES, J.; GIBSON, G.; FORMENTIN, K.; BEER, M.; RASTALL, R. Inhibition of the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* strains to HT-29 cells in culture by chito-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 57-59, 2006.

RIBEIRO, M. P.; ESPIGA, A.; SILVA, D.; BAPTISTA, P.; HENRIQUES, J.; FERREIRA, C.; SILVA, J. C.; BORGES, J. P.; PIRES, E.; CHAVES, P.; CORREIA, I. J. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, p. 817-824, 2004.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: proprieties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31 p. 603-632, 2006.

ROBBINS, P. W.; ALBRIGHT, C.; BENCELD, B. Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 443-447, 1988.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. London: Mc Millan Press, 1992. 350 p.

ROBERTS, R. L.; CABIB, E. *Serratia marcescens* Chitinase: One-step purification and use for the determination of chitin. **Analytical Biochemistry**, v. 127, p. 402-412, 1982.

ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. **Journal of General Microbiology**, v. 134, n. 1, 169-176, 1988.

RODRIGUEZ-KABANA, R.; GODOY, G.; MORGAN-JONES, G.; SHELBY, R. A. The determination of soil chitinase activity: conditions for assay and ecological studies. **Plant and Soil**, v. 75, n. 1, p. 95-106, 1983.

ROSEMAN, S. Glucosamina metabolism. I. N acetylglucosamine deacetylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 115, 124, 1957.

ROSEMAN, S. A conversation with Saul Roseman. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 300, p. 5-8, 2003.

ROSEMAN, S.; LI, XIBING.; COMB, D. Conversion of chitin into *N*-acetylglucosamine, glucosamine and bioethanol. **Patent**, n. WO 2010/123784 A2, 2010.

RUDALL, K. M.; KENCHING, W. Chitin System. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 48, n. 4, p. 597-605, 1973.

SAAVEDRA, M. J.; PEREA, V.; FONTES, M. C.; MARTINS, C.; MARTINEZ-MURCIA, A. Phylogenetic identification of *Aeromonas* strains isolated from carcasses of pig as new members of the species *Aeromonas allosaccharophila*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 91, n. 2, p. 159-167, 2007.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v.11, n. 4, p. 317-338, 1993.

SARKAR, S.; PRAMANIK, A.; MITRA, A.; MUKHERJEE, J. Bioprocessing data for the production of marine enzymes. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1323-1372, 2010.

SASHIWA, H.; FUJISHIMA, S.; YAMANO, N.; KAWASAKI, N.; NAKAYAMA, A.; MURAKI, E.; HIRAGA, K.; ODA, K.; AIBA, S. Production of *N*-acetyl-D-glucosamine from α -chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H2330. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 761-763, 2002.

SCIGELOVA, M; CROUT, D. G. H. G. Microbial β -*N*-acetylhexosaminidases and their biotechnological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 3-14, 1999.

SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1467- 1480, 2004.

SESHADRI, R.; JOSEPH, S. W.; CHOPRA, A. K.; SHA, J.; SHAW, J.; GRAF, J.; HAFT, D.; WU, M.; REN, Q.; ROSOVITZ, M. J.; MADUPU, R.; TALLON, L.; KIM, M.; JIN, S.; VUONG, H.; STINE, O.C.; ALI, A.; HORNEAMAN, A. J.; HEIDELBERG, J. F. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 8272-8282, 2006.

SHA, J.; EROVA, T. E.; ALYEA, R. A.; WANG, S.; OLANO, J. P.; PANCHOLI, V.; CHOPRA, A. K. Surface-expressed enolase contributes to the pathogenesis of clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 3095-3107, 2009.

SHAHABUDDIN, M.; TOYOSHIMA, T.; AIKAWA, M.; KASLOW, D.C. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, U. S. A.**, v. 90, p. 4266-4270, 1993.

SHEN, K. T.; CHEN, M. H.; CHAN, H. Y.; JENG, J. H.; WANG, Y. J. Inhibitory effects of chitoooligosaccharides on tumor growth and metastasis. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 47, p.1864-1871, 2009.

SHOJI, A.; IGA, T.; INAGAKI, S.; KOBAYASHI, K.; MATAHIRA, Y.; SAKAI, K. Metabolic disposition of [14C] *N*-acetylglucosamine in rats. **Chitin Chitosan Research**, v. 5, p. 34-42, 1999.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SKUJINS, J. J.; POTGIETER, H. J.; ALEXANDER, M. Dissolution of fungal cell walls by a streptomycete chitinase and beta-(1-3) glucanase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 111, n. 2, p. 358-364, 1965.

SOLER, L.; YÁÑEZ, M. A.; CHACON, M. R.; AGUILERA-ARREOLA, M. G.; CATALÁN, V.; FIGUEIRAS, M. J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1511-1519, 2004.

SOMOGY, M. A new reagent for determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 61-68, 1945.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SOUZA, C. P. **Diversidade de bactérias quitinolíticas isoladas em amostras de água do mar e plâncton coletadas na região costeira do estado de São Paulo**. 204f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOUZA, C. P.; ROSERO, E. M. B.; ALMEIDA, B. C.; MARTINS, G.; ALBERTINI, L. S.; RIVERA, I. N. G. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 2079-2082, 2009.

SOUZA, C.P.; ALMEIDA, B. C.; COLWELL, R.R.; RIVERA, I. N. G. The importance of chitin in the marine environment. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 823-830, 2011.

STEFANIDI, E.; VORGAS, C. E. Molecular analysis of the gene encoding a new chitinase from the marine psychrophilic bacterium *Moritella marina* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. **Extremophiles**, v. 12, n. 4, p. 541-552, 2008.

SUGINTA, W. Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 212-220, 2007.

SUGINTA, W.; PANTOOM, S.; PRINZ, H. Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. **Chemistry & Biology**, v.2, p. 191-202, 2009.

SUZUKI, K.; TAIYOJI, M.; SUGAWARA, N.; NIKAIIDOU, N.; HENRISSAT, B.; WATANABE, T. The third chitinase gene (*chiC*) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. **The Biochemical Journal**, v. 343, p. 587-596, 1999.

SITRIT, Y.; VORGIAS, C. E.; CHET, I.; OPPENHEIM, A. B. Cloning and primary structure of the *chiA* gene from *Aeromonas caviae*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 4187-4189, 1995.

SVITIL, A. L.; NÍ CHADHAIN, S. M.; MOORE, J. A.; KIRCHMAN, D. L. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* on different forms of chitin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 408-413, 1997.

TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; ZANGIROLAMI, T. C.; RAW, I.; TANIZAKI, M. M. Improved cultivation conditions for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 182-188, 2006.

TAKAYANAGI, T.; AJISAKA, K.; TAKIGUCHI, Y.; SHIMAHARA, K. Isolation and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* X-7u. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1078, p. 404-410, 1991.

TANAKA, H.; OGASAWARA, N.; NAKAJIMA, T.; TAMARI, K. Cell walls of *Piricularia oryzae*. I. Selective enzymolysis of *Piricularia oryzae* walls by wall-lytic enzymes of *Bacillus circulans* WL-12. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 16, p. 39-60, 1970.

TANAKA, T.; FUKUI, T.; IMANAKA, T. Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 38, p. 35629–35635, 2001.

TEWS, I.; TERWISSCHA VAN SHELTINGA, A. C.; PERRAKIS, A.; WILSON, K. S.; DIJKSTRA, B. W. Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 7954-7959, 1997.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of *Vibrios*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 3, p. 403-431, 2004.

THOMPSON, F. L.; GEVER, D.; THOMPSON, C. C.; DAWYNDDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; MUNN, C. B.; SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied an Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5107-5115, 2005.

TJOELKER, L. W.; GOSTING, L.; FREY, S., HUNTER, C. L.; TRONG, H. L.; STEINER, B.; BRAMMER, H.; GRAY, P. W. Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 514 -520, 2000.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TRONSMO, A.; HARMAN, G. E. Detection and quantification of *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. **Analytical Biochemistry**, v. 208, p. 74-79, 1993.

TRUDEL, J.; ASSELAIN, A. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 189, p. 249-253, 1990.

TSENG, C. L.; LENG, C. H. Influence of medium components on the expression of recombinant lipoproteins in *Escherichia coli*. **Biotechnologically Relevant Enzymes and Proteins**, v. 93, p. 1539-1552, 2011.

UEDA, M.; ARAI, M. Purification and some properties of chitinases from *Aeromonas* sp. N°. 10S-24. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 3, p. 460-464, 1992.

UEDA, M.; FUJIWARA, A.; KAWAGUCHI, T.; ARAI, M. Purification and some properties of six chitinases from *Aeromonas* sp. N°. 10S-24. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 2162-2164, 1995.

UEDA, M.; FUJITA, Y.; KAWAGUCHI, T.; ARAI, M. Cloning, nucleotide sequence and expression of the β -N-acetylglucosaminidase gene from *Aeromonas* sp. N°. 10S-24. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, p. 164-169, 2000.

UEDA M.; KOJIMA M.; YOSHIKAWA, T.; MITSUDA, N.; KEIICHI, A.; KAWAGUCHI, T.; MIYATAKE, K.; ARAI MOTOO.; FUKAMIZO, T. A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. N°.10S-24. Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 2513-2520, 2003.

URIA, A. R.; CHASANA, E.; FAWZY, Y. N. Optimization of *Bacillus* sp. K29-14 chitinase production using marine crustacean waste. **Journal of Coastal Development**, 2006.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends Microbiology**, v. 11, p. 479-487, 2003.

VAN AALTEN, D. M.; KOMANDER, D.; SYNSTAD, B.; GASEIDNES, S.; PETER, M. G.; EIJSSINK, V. G. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, U. S. A., v. 98, p. 8979-8984, 2001.

VOSSBRINCK, C. R.; BAKER, M. D.; DIDIER, E. S.; EBRUNNERVOSSBRINCK, B. A.; SHADDUCK, J. A. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.40, p. 354-362, 1993.

WANG, S. L.; CHANG, W. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes Extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 380-386, 1997.

WATANABE, T.; SUZUKI, K.; OYAHAGI, W.; OHNISHI, K.; TANAKA, H. Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinases and to the type III homology units of fibronectin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 15659-15665, 1990.

WEN, C. M.; TSENG, C. S.; CHENG, C. Y.; LI, Y. K. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 213-219, 2002.

YABUKI, M.; MIZUSHINA, K.; AMATATSU, T.; ANDO, A.; FUJII, T.; SHIMADA, M.; YAMASHITA, M. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *Anaerogenes* A52. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 25-38. 1986.

YAMAMOTO, S.; BOUVET, P. J. M.; HARAYAMA, S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 87-95, 1999.

YAMAMOTO, S.; KASAI, H.; ARNOLD, D. L.; JACKSON, R. W.; VIVIAN, A, HARAYAMA, S. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes **Microbiology**, v. 146, p. 2385-2394, 2000.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J.; The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, p. 508-514, 1954.

YOU, Y.; PARK, W. H.; KO, B. M.; MIN, B. M. Effects of PVA sponge containing chitooligosaccharide in the early stage of wound healing. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v. 15, p. 297-301, 2004.

YU, C.; BASSLER, B. L.; ROSEMAN, S. Chemotaxis of the marine bacterium *Vibrio furnissii* to sugars. A potential mechanism for initiating the chitin catabolic cascade. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 9405-9409, 1993.

ZHANG, Z.; YUEN, G. Y.; SARATH, G.; PENHEITER, A. R. Chitinases from plant disease biocontrol agent *Stenotrophomonas maltophilia* C3. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 204-211, 2001.

ZHOU, S. N.; YANG, C. Y.; LU, Y. J.; HUANG, L.; CAI, C. H.; LIN, Y. C. Isolation and characterization of chitinase from a marine bacterium *Vibrio* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 745-746, 1999.

ZHOU, G.; ZHANG, H.; HE, Y.; HE, L. Identification of a chitin deacetylase producing bacteria isolated from soil and its fermentation optimization. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 23, p. 2597-2603, 2010.

ZHU, Z.; ZHENG, T.; HOMER, R. J.; KIM, Y. K.; CHEN, N. Y.; COHN, L.; HAMID, Q.; ELIAS, J.A. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. **Science**, v. 304, p. 1678-1682, 2004.

ZOBELL, C. E.; RITTENBERG, S. C. The occurrence and characteristics of chitinoclastics bacteria in the sea. **Journal of Bacteriology**, v. 35, n. 3, p. 275-287, 1938.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Avaliação das condições de cultivo: Contagem de bactérias quitinolíticas de acordo à temperatura e período de incubação

Isolado	Local de Coleta	Temperatura (°C)	Condições		Tempo (h)				
			Concentração de Substrato (%)	pH	T=0	T=24	T=48	T=72	T=96
CH101	Canal de São Sebastião	28	1,2	7,0	7,6E+06	3,2E+09	5,9E+09	2,5E+09	2,4E+09
CH147	Baixada Santista	28	1,2	7,0	3,7E+06	6,3E+08	1,1E+09	8,1E+08	6,2E+08
CH149	Baixada Santista	28	1,2	7,0	1,4E+06	6,7E+08	4,5E+08	1,3E+08	3,0E+07
CH150	Baixada Santista	28	1,2	7,0	1,8E+06	4,8E+08	4,3E+08	7,4E+07	3,4E+07
CH151	Baixada Santista	28	1,2	7,0	3,2E+06	3,6E+08	4,4E+08	1,1E+08	5,8E+07
CH125	Baixada Santista	28	1,2	7,0	5,2E+06	3,2E+09	8,4E+08	3,6E+08	2,0E+08
CH129	Baixada Santista	28	1,2	7,0	1,1E+06	5,6E+08	1,3E+08	7,6E+07	3,9E+07
CH141	Baixada Santista	28	1,2	7,0	1,2E+06	3,0E+08	1,8E+08	1,4E+08	1,3E+08
CH286	Baixada Santista	28	1,2	7,0	1,6E+06	8,1E+08	3,3E+08	2,4E+08	4,4E+07
CHZ52	Baixada Santista	28	1,2	7,0	8,1E+06	7,2E+08	7,1E+08	5,1E+08	1,1E+08
CHZ113	Canal de São Sebastião	28	1,2	7,0	1,4E+06	2,0E+09	5,3E+09	1,0E+08	6,6E+07
CHZ306	Baixada Santista	28	1,2	7,0	4,9E+06	4,7E+09	5,7E+09	4,8E+09	2,9E+09
CH101	Canal de São Sebastião	37	1,2	7,0	3,1E+06	6,1E+07	9,3E+07	9,7E+06	5,6E+06
CH147	Baixada Santista	37	1,2	7,0	1,1E+06	6,0E+08	1,5E+08	8,4E+06	3,7E+06
CH149	Baixada Santista	37	1,2	7,0	1,7E+06	3,4E+08	2,2E+07	3,1E+06	1,1E+06
CH150	Baixada Santista	37	1,2	7,0	5,3E+06	7,5E+03	4,8E+03	4,4E+03	1,2E+03
CH151	Baixada Santista	37	1,2	7,0	4,0E+06	6,6E+07	7,1E+07	5,2E+07	3,7E+07
CH125	Baixada Santista	37	1,2	7,0	1,2E+06	3,0E+08	1,0E+06	4,4E+05	3,3E+05
CH129	Baixada Santista	37	1,2	7,0	4,8E+06	2,5E+08	3,7E+07	3,8E+06	3,3E+05
CH141	Baixada Santista	37	1,2	7,0	1,0E+06	5,9E+03	3,7E+03	3,3E+03	2,2E+03
CH286	Baixada Santista	37	1,2	7,0	3,1E+06	4,0E+08	4,6E+07	9,0E+06	3,4E+06
CHZ52	Baixada Santista	37	1,2	7,0	2,4E+06	1,8E+08	6,4E+07	3,2E+06	1,2E+06
CHZ113	Canal de São Sebastião	37	1,2	7,0	1,3E+06	6,5E+03	2,1E+03	1,2E+03	1,1E+03
CHZ306	Baixada Santista	37	1,2	7,0	1,9E+06	1,5E+07	1,1E+06	6,7E+05	3,9E+05

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE B – Avaliação das condições de cultivo: Representação gráfica do crescimento acordo à temperatura e período de incubação para cada bactéria quitinolítica

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE C - Avaliação das condições de cultivo: Contagem de bactérias quitinolíticas de acordo à concentração de quitina e período de incubação

Condições					Tempo (h)				
Isolado	Local de Coleta	Temperatura (°C)	Concentração de Substrato (%)	pH	T=0	T=24	T=48	T=72	T=96
CH101	Canal de São Sebastião	28	0,5	7,0	6,7E+06	1,2E+09	6,1E+08	3,7E+08	3,5E+08
CH147	Baixada Santista	28	0,5	7,0	5,6E+06	8,2E+08	3,8E+08	1,6E+08	7,1E+07
CH149	Baixada Santista	28	0,5	7,0	1,4E+06	3,3E+08	6,1E+08	4,2E+07	1,5E+07
CH150	Baixada Santista	28	0,5	7,0	1,2E+06	1,9E+09	2,7E+08	8,9E+07	4,2E+07
CH151	Baixada Santista	28	0,5	7,0	1,1E+06	4,8E+08	3,9E+08	3,1E+06	2,4E+06
CH125	Baixada Santista	28	0,5	7,0	1,9E+06	1,7E+08	1,8E+07	9,8E+06	6,0E+06
CH129	Baixada Santista	28	0,5	7,0	6,3E+06	5,4E+08	3,4E+08	1,3E+08	2,0E+07
CH141	Baixada Santista	28	0,5	7,0	1,5E+06	1,3E+08	6,9E+06	5,6E+06	1,4E+06
CH286	Baixada Santista	28	0,5	7,0	3,8E+06	2,0E+09	4,9E+08	4,3E+07	3,1E+07
CHZ52	Baixada Santista	28	0,5	7,0	5,2E+06	1,9E+08	1,1E+08	3,8E+07	3,5E+07
CHZ113	Canal de São Sebastião	28	0,5	7,0	1,3E+06	1,8E+08	9,4E+08	5,7E+07	5,4E+07
CHZ306	Baixada Santista	28	0,5	7,0	4,1E+06	1,5E+09	1,1E+09	7,0E+08	4,4E+08
CH101	Canal de São Sebastião	28	1,2	7,0	7,6E+06	3,2E+09	5,9E+09	2,5E+09	2,4E+09
CH147	Baixada Santista	28	1,2	7,0	3,7E+06	6,3E+08	1,1E+09	8,1E+08	6,2E+08
CH149	Baixada Santista	28	1,2	7,0	1,4E+06	6,7E+08	4,5E+08	1,3E+08	3,0E+07
CH150	Baixada Santista	28	1,2	7,0	1,8E+06	4,8E+08	4,3E+08	7,4E+07	3,4E+07
CH151	Baixada Santista	28	1,2	7,0	3,2E+06	3,6E+08	4,4E+08	1,1E+08	5,8E+07
CH125	Baixada Santista	28	1,2	7,0	5,2E+06	3,2E+09	8,4E+08	3,6E+08	2,0E+08
CH129	Baixada Santista	28	1,2	7,0	1,1E+06	5,6E+08	1,3E+08	7,6E+07	3,9E+07
CH141	Baixada Santista	28	1,2	7,0	1,2E+06	3,0E+08	1,8E+08	1,4E+08	1,3E+08
CH286	Baixada Santista	28	1,2	7,0	1,6E+06	8,1E+08	3,3E+08	2,4E+08	4,4E+07
CHZ52	Baixada Santista	28	1,2	7,0	8,1E+06	7,2E+08	7,1E+08	5,1E+08	1,1E+08
CHZ113	Canal de São Sebastião	28	1,2	7,0	1,4E+06	2,0E+09	5,3E+09	1,0E+08	6,6E+07
CHZ306	Baixada Santista	28	1,2	7,0	4,9E+06	4,7E+09	5,7E+09	4,8E+09	2,9E+09
CH101	Canal de São Sebastião	28	2,5	7,0	2,2E+06	1,0E+10	5,8E+09	1,2E+09	1,2E+09
CH147	Baixada Santista	28	2,5	7,0	5,1E+06	3,0E+09	5,6E+08	2,2E+08	9,5E+07
CH149	Baixada Santista	28	2,5	7,0	1,4E+06	2,0E+09	6,3E+08	5,3E+08	2,2E+08
CH150	Baixada Santista	28	2,5	7,0	1,8E+06	1,8E+09	4,4E+09	1,5E+09	1,0E+09
CH151	Baixada Santista	28	2,5	7,0	2,1E+06	9,8E+08	1,6E+09	8,7E+08	4,4E+08
CH125	Baixada Santista	28	2,5	7,0	1,2E+06	8,1E+08	9,3E+07	8,4E+07	4,1E+07
CH129	Baixada Santista	28	2,5	7,0	2,0E+06	3,5E+08	9,6E+08	7,1E+08	5,6E+08
CH141	Baixada Santista	28	2,5	7,0	1,4E+06	6,6E+09	5,1E+09	2,8E+09	9,1E+08
CH286	Baixada Santista	28	2,5	7,0	3,1E+06	4,6E+09	1,9E+10	3,3E+09	1,2E+09
CHZ52	Baixada Santista	28	2,5	7,0	1,7E+06	3,4E+09	6,1E+08	2,7E+08	1,2E+08
CHZ113	Canal de São Sebastião	28	2,5	7,0	1,6E+06	2,3E+09	6,3E+08	9,2E+07	3,6E+07
CHZ306	Baixada Santista	28	2,5	7,0	1,4E+06	9,8E+08	4,6E+09	6,6E+08	3,7E+08

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE D - Avaliação das condições de cultivo: Representação gráfica do crescimento de acordo à concentração de quitina e período de incubação para cada bactéria quitinolítica

- 0,5%
- 1,2%
- ▲ 2,5%

FONTE: CARDOZO, 2012.

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE E - Avaliação das condições de cultivo: Contagem de bactérias quitinolíticas de acordo ao pH e período de incubação

Isolado	Local de Coleta	Condições			Tempo (h)				
		Temperatura (°C)	Concentração de Substrato (%)	pH	T=0	T=24	T=48	T=72	T=96
CH101	Canal de São Sebastião	28	2,5	6,0	3,7E+06	2,2E+09	2,7E+09	2,8E+09	5,5E+08
CH147	Baixada Santista	28	2,5	6,0	3,4E+06	8,3E+09	6,4E+09	1,2E+09	3,8E+08
CH149	Baixada Santista	28	2,5	6,0	4,5E+06	5,3E+09	2,2E+09	1,0E+09	8,3E+08
CH150	Baixada Santista	28	2,5	6,0	8,7E+06	8,4E+09	3,9E+08	3,3E+08	5,8E+07
CH151	Baixada Santista	28	2,5	6,0	4,3E+06	1,6E+10	9,8E+08	3,4E+08	6,6E+07
CH125	Baixada Santista	28	1,2	6,0	3,6E+06	6,8E+08	6,0E+08	5,5E+08	1,3E+08
CH129	Baixada Santista	28	2,5	6,0	3,3E+06	1,7E+10	6,9E+08	5,0E+08	1,3E+07
CH141	Baixada Santista	28	2,5	6,0	7,0E+06	5,3E+09	2,4E+09	2,1E+09	5,9E+07
CH286	Baixada Santista	28	2,5	6,0	8,6E+06	3,0E+10	7,2E+09	2,9E+09	2,5E+09
CHZ52	Baixada Santista	28	2,5	6,0	3,5E+06	2,2E+10	6,8E+09	5,8E+09	2,8E+09
CHZ113	Canal de São Sebastião	28	1,2	6,0	3,1E+06	5,4E+09	2,3E+09	2,1E+09	3,8E+08
CHZ306	Baixada Santista	28	1,2	6,0	8,1E+06	9,2E+08	9,9E+08	5,6E+08	1,6E+08
CH101	Canal de São Sebastião	28	2,5	7,0	2,2E+06	1,0E+10	5,8E+09	1,2E+09	1,2E+09
CH147	Baixada Santista	28	2,5	7,0	5,1E+06	3,0E+09	5,6E+08	2,2E+08	9,5E+07
CH149	Baixada Santista	28	2,5	7,0	1,4E+06	2,0E+09	6,3E+08	5,3E+08	2,2E+08
CH150	Baixada Santista	28	2,5	7,0	1,8E+06	1,8E+09	4,4E+09	1,5E+09	1,0E+09
CH151	Baixada Santista	28	2,5	7,0	2,1E+06	9,8E+08	1,6E+09	8,7E+08	4,4E+08
CH125	Baixada Santista	28	1,2	7,0	5,2E+06	3,2E+09	8,4E+08	3,6E+08	2,0E+08
CH129	Baixada Santista	28	2,5	7,0	2,0E+06	3,5E+08	9,6E+08	7,1E+08	5,6E+08
CH141	Baixada Santista	28	2,5	7,0	1,4E+06	6,6E+09	5,1E+09	2,8E+09	9,1E+08
CH286	Baixada Santista	28	2,5	7,0	3,1E+06	4,6E+09	1,9E+10	3,3E+09	1,2E+09
CHZ52	Baixada Santista	28	2,5	7,0	1,7E+06	3,4E+09	6,1E+08	2,7E+08	1,2E+08
CHZ113	Canal de São Sebastião	28	1,2	7,0	1,4E+06	2,0E+09	5,3E+09	1,0E+08	6,6E+07
CHZ306	Baixada Santista	28	1,2	7,0	4,9E+06	4,7E+09	5,7E+09	4,8E+09	2,9E+09
CH101	Canal de São Sebastião	28	2,5	8,0	4,7E+06	3,8E+09	1,5E+09	4,2E+08	3,4E+08
CH147	Baixada Santista	28	2,5	8,0	9,1E+06	5,7E+09	6,5E+08	6,3E+08	4,7E+08
CH149	Baixada Santista	28	2,5	8,0	5,3E+06	1,3E+10	2,7E+10	2,2E+10	3,5E+08
CH150	Baixada Santista	28	2,5	8,0	7,7E+06	2,0E+10	5,6E+09	3,4E+08	1,4E+08
CH151	Baixada Santista	28	2,5	8,0	3,4E+06	3,5E+09	4,4E+08	3,2E+08	1,2E+08
CH125	Baixada Santista	28	1,2	8,0	6,8E+06	5,6E+09	1,2E+09	3,7E+08	5,5E+07
CH129	Baixada Santista	28	2,5	8,0	4,2E+06	6,9E+09	3,6E+09	2,0E+09	1,8E+09
CH141	Baixada Santista	28	2,5	8,0	3,7E+06	2,2E+10	8,4E+09	1,0E+09	7,9E+08
CH286	Baixada Santista	28	2,5	8,0	7,9E+06	4,3E+10	5,7E+09	1,4E+09	3,5E+08
CHZ52	Baixada Santista	28	2,5	8,0	3,1E+06	5,7E+09	5,9E+08	3,5E+08	3,9E+07
CHZ113	Canal de São Sebastião	28	1,2	8,0	5,7E+06	1,9E+10	1,2E+09	5,4E+08	3,7E+07
CHZ306	Baixada Santista	28	1,2	8,0	5,4E+06	1,0E+10	6,0E+09	3,5E+09	3,4E+08

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE F - Avaliação das condições de cultivo: Representação gráfica do crescimento de acordo ao pH e período de incubação para cada bactéria quitinolítica, em meio de cultura contendo 2,5% de quitina

FONTE: CARDOZO, 2012.

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE G - Avaliação das condições de cultivo: Representação gráfica do crescimento de acordo ao pH e período de incubação para cada bactéria quitinolítica em meio de cultura contendo 1,2% de quitina

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE H - Avaliação da degradação de quitina: Contagem de bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação nas condições de cultivo pré-determinadas

Isolado	T=0			T=24			T=48			T=72			T=96		
	UFC.mL ⁻¹	Média	Desvio Padrão	UFC.mL ⁻¹	Média	Desvio Padrão	UFC.mL ⁻¹	Média	Desvio Padrão	UFC.mL ⁻¹	Média	Desvio Padrão	UFC.mL ⁻¹	Média	Desvio Padrão
CH101	1,8E+05	1,7E+05	1,48E+04	5,60E+09	5,0E+09	9,19E+08	7,80E+07	6,8E+07	1,41E+07	4,10E+07	3,7E+07	6,36E+06	2,02E+07	1,9E+07	1,48E+06
	1,6E+05			4,30E+09			5,80E+07			3,20E+07			1,81E+07		
CH147	2,45E+06	2,6E+06	1,63E+05	1,71E+09	1,8E+09	9,19E+07	1,27E+09	1,2E+09	1,13E+08	6,80E+07	6,0E+07	1,20E+07	5,60E+07	4,7E+07	1,27E+07
	2,68E+06			1,84E+09			1,11E+09			5,10E+07			3,80E+07		
CH149	1,28E+05	1,2E+05	1,34E+04	9,80E+08	9,5E+08	4,95E+07	1,30E+09	1,3E+09	6,36E+07	5,30E+08	4,8E+08	7,78E+07	4,90E+07	4,3E+07	8,49E+06
	1,09E+05			9,10E+08			1,39E+09			4,20E+08			3,70E+07		
CH150	5,70E+03	5,0E+03	1,06E+03	4,90E+07	5,4E+07	7,07E+06	4,10E+07	4,9E+07	1,13E+07	3,80E+07	4,3E+07	7,07E+06	1,38E+07	1,3E+07	1,13E+06
	4,20E+03			5,90E+07			5,70E+07			4,80E+07			1,22E+07		
CH151	1,99E+04	1,9E+04	9,90E+02	5,50E+07	5,8E+07	4,24E+06	4,90E+07	4,2E+07	9,90E+06	1,65E+07	1,5E+07	1,56E+06	1,22E+07	1,3E+07	1,06E+06
	1,85E+04			6,10E+07			3,50E+07			1,43E+07			1,37E+07		
CH125	3,20E+05	4,2E+05	1,34E+05	4,80E+08	6,1E+08	1,84E+08	9,80E+07	9,0E+07	1,20E+07	5,20E+07	6,5E+07	1,84E+07	5,90E+07	5,1E+07	1,20E+07
	5,10E+05			7,40E+08			8,10E+07			7,80E+07			4,20E+07		
CH129	1,03E+05	4,7E+05	5,21E+05	8,40E+07	7,3E+07	1,56E+07	5,80E+07	4,7E+07	1,56E+07	4,90E+07	4,2E+07	9,90E+06	9,00E+06	9,9E+06	1,20E+06
	8,40E+05			6,20E+07			3,60E+07			3,50E+07			1,07E+07		
CH141	7,70E+04	8,1E+04	5,66E+03	4,1E+08	3,5E+08	9,19E+07	3,19E+08	3,1E+08	6,36E+06	2,26E+07	2,2E+07	1,06E+06	1,41E+07	1,3E+07	9,90E+05
	8,50E+04			2,8E+08			3,10E+08			2,11E+07			1,27E+07		
CH286	5,90E+05	5,3E+05	9,19E+04	3,30E+09	4,0E+09	9,90E+08	1,21E+09	1,2E+09	8,49E+07	5,70E+08	4,4E+08	1,84E+08	3,60E+08	3,0E+08	8,49E+07
	4,60E+05			4,70E+09			1,09E+09			3,10E+08			2,40E+08		
CHZ52	2,12E+05	2,2E+05	1,20E+04	1,33E+09	1,4E+09	7,78E+07	1,10E+09	1,2E+09	1,13E+08	5,40E+08	6,3E+08	1,27E+08	4,50E+08	3,6E+08	1,34E+08
	2,29E+05			1,44E+09			1,26E+09			7,20E+08			2,60E+08		
CHZ113	7,90E+04	8,7E+04	1,13E+04	3,70E+08	4,4E+08	9,90E+07	1,64E+08	1,5E+08	1,63E+07	3,40E+07	3,3E+07	1,56E+06	7,30E+06	6,5E+06	1,20E+06
	9,50E+04			5,10E+08			1,41E+08			3,18E+07			5,60E+06		
CHZ306	1,42E+07	1,3E+07	1,20E+06	6,90E+08	6,4E+08	7,07E+07	4,70E+08	5,3E+08	8,49E+07	5,50E+08	4,8E+08	9,90E+07	5,30E+07	4,6E+07	1,06E+07
	1,25E+07			5,90E+08			5,90E+08			4,10E+08			3,80E+07		

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE I - Avaliação da degradação de quitina: Medida dos halos de hidrólise produzidos por cada bactéria quitinolítica em ágar mineral contendo 1,2% de quitina, pH 7,0, após 96 horas de incubação a 28 °C

Isolados	Medida do Halo com Colônia (mm)		Medida da Colônia (mm)		Medida do Halo (mm)	Média (mm)	Desvio Padrão
	Horizontal	Vertical	Horizontal	Vertical			
CH101	4,24	4,29	1,88	1,92	2,37	2,19	0,19
	4,16	4,18	2,16	2,21	1,99		
	4,21	4,25	1,99	2,04	2,22		
CH147	5,28	5,33	1,75	1,79	3,54	3,46	0,08
	5,37	5,34	1,96	2,01	3,37		
	5,31	5,35	1,84	1,87	3,48		
CH149	4,81	4,84	1,46	1,52	3,34	3,39	0,05
	4,96	5,01	1,53	1,57	3,44		
	4,91	4,87	1,51	1,47	3,40		
CH150	4,68	4,72	1,47	1,51	3,21	3,22	0,02
	4,75	4,79	1,52	1,55	3,24		
	4,73	4,77	1,53	1,57	3,20		
CH151	4,94	4,97	0,98	1,02	3,96	3,78	0,15
	4,91	4,95	1,26	1,22	3,69		
	4,86	4,91	1,17	1,21	3,70		
CH125	7,73	7,77	2,50	2,52	5,24	5,15	0,09
	7,51	7,55	2,46	2,48	5,06		
	7,62	7,66	2,49	2,51	5,14		
CH129	6,59	6,64	1,69	1,72	4,91	4,79	0,12
	6,71	6,67	2,01	2,04	4,67		
	6,68	6,63	1,86	1,85	4,80		
CH141	2,35	2,38	1,28	1,31	1,07	1,58	0,48
	3,17	3,21	1,15	1,19	2,02		
	2,86	2,82	1,17	1,21	1,65		
CH286	7,04	7,08	2,47	2,42	4,62	4,90	0,25
	7,12	7,07	2,00	2,04	5,08		
	7,17	7,13	2,12	2,14	5,02		
CHZ52	8,55	8,50	2,40	2,42	6,12	6,18	0,07
	8,71	8,68	2,44	2,45	6,25		
	8,61	8,58	2,41	2,43	6,18		
CHZ113	4,76	4,73	1,70	1,73	3,03	3,09	0,07
	5,47	5,42	2,29	2,26	3,17		
	4,99	5,03	1,92	1,94	3,08		
CHZ306	8,76	8,73	2,10	2,13	6,63	6,26	0,33
	8,59	8,61	2,59	2,61	6,00		
	8,64	8,59	2,44	2,47	6,16		

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE J - Avaliação da degradação de quitina: Concentrações de *N*-acetil-glicosamina, quitobiose e quitotriose liberadas pelas bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação e às condições de cultivo pré-determinadas

Isolados	<i>N</i> -acetil-glicosamina (mg)					Quitobiose (µg)					Quitotriose (µg)				
	T:0	T:24	T:48	T:72	T:96	T:0	T:24	T:48	T:72	T:96	T:0	T:24	T:48	T:72	T:96
CH101	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00
CH147	0,11	0,12	0,01	0,00	0,06	0,00	2,00	1,00	0,00	0,00	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00
CH149	0,14	0,13	0,04	0,11	0,23	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	3,00	3,00	3,00	2,00
CH150	0,12	0,16	0,04	0,08	0,03	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
CH151	0,20	2,72	0,12	0,02	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00
CH125	0,13	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
CH129	0,12	206,0	628,0	655,0	621,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CH141	0,15	0,17	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	2,00	1,00	1,00	1,00
CH286	0,16	0,13	2,17	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00
CHZ52	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00
CHZ113	0,12	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
CHZ306	0,16	0,04	0,03	0,06	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE K - Avaliação da degradação de quitina: Concentrações de açúcares solúveis totais (AST) liberadas pelas bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação e às condições de cultivo pré-determinadas

Isolado	T=0			T=24			T=48			T=72			T=96		
	[] mg	Média	Desvio Padrão	[] mg	Média	Desvio Padrão	[] mg	Média	Desvio Padrão	[] mg	Média	Desvio Padrão	[] mg	Média	Desvio Padrão
CH101	0,325	0,328	0,004	4,084	4,109	0,036	3,721	3,726	0,008	4,392	4,400	0,011	4,262	4,268	0,009
	0,331			4,135			3,732			4,407			4,275		
CH147	0,284	0,281	0,005	5,404	5,402	0,003	9,172	9,166	0,008	8,667	8,670	0,004	10,088	10,083	0,007
	0,277			5,400			9,161			8,673			10,078		
CH149	0,236	0,236	0,000	2,707	2,710	0,004	1,769	1,779	0,015	29,084	29,107	0,032	3,240	3,246	0,008
	0,236			2,712			1,789			29,130			3,252		
CH150	0,314	0,319	0,007	5,591	5,590	0,003	3,641	3,641	0,000	5,173	5,175	0,003	4,048	4,045	0,004
	0,323			5,588			3,641			5,177			4,042		
CH151	0,298	0,295	0,005	3,883	3,881	0,003	6,602	6,598	0,005	7,905	7,903	0,003	8,544	8,538	0,009
	0,291			3,880			6,594			7,901			8,531		
CH125	0,280	0,276	0,005	0,583	0,583	0,000	18,098	18,097	0,001	1,948	1,947	0,001	26,355	26,365	0,015
	0,272			0,583			18,096			1,946			26,376		
CH129	0,477	0,479	0,003	288,728	288,747	0,026	711,355	711,335	0,028	749,266	749,284	0,025	717,401	717,418	0,023
	0,480			288,765			711,315			749,301			717,434		
CH141	0,643	0,643	0,000	3,592	3,591	0,001	4,241	4,228	0,019	4,629	4,623	0,008	5,739	5,751	0,017
	0,643			3,590			4,214			4,617			5,764		
CH286	0,897	0,898	0,001	2,260	2,263	0,004	2,975	2,975	0,000	4,587	4,588	0,001	3,339	3,338	0,001
	0,898			2,266			2,975			4,589			3,337		
CHZ52	0,726	0,728	0,003	20,251	20,259	0,012	7,040	7,044	0,005	7,156	7,156	0,000	6,592	6,596	0,005
	0,730			20,268			7,048			7,156			6,600		
CHZ113	0,552	0,555	0,004	1,702	1,769	0,094	0,723	0,724	0,003	0,526	0,526	0,000	1,122	1,142	0,028
	0,558			1,835			0,726			0,526			1,161		
CHZ306	0,496	0,496	0,000	4,515	4,516	0,001	2,588	2,585	0,004	2,043	2,040	0,004	2,344	2,345	0,001
	0,496			4,517			2,582			2,037			2,346		

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE L - Avaliação da degradação de quitina: Atividade de *N*-acetil-glicosaminidases pelas bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação e às condições de cultivo pré-determinadas

Isolado	T=0			T=24			T=48			T=72			T=96		
	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão
CH101	0,0001	0,0002	0,00014	0,0012	0,0012	0,00000	0,0016	0,0014	0,00019	0,0030	0,0031	0,00014	0,0045	0,0042	0,00045
	0,0003			0,0012			0,0013			0,0032			0,0039		
CH147	0,0001	0,0002	0,00007	0,0003	0,0005	0,00021	0,0003	0,0002	0,00009	0,0007	0,0008	0,00007	0,0017	0,0015	0,00019
	0,0002			0,0006			0,0002			0,0008			0,0014		
CH149	0,0001	0,0001	0,00008	0,0045	0,0045	0,00000	0,0331	0,0331	0,00000	0,0087	0,0088	0,00017	0,0390	0,0390	0,00008
	0,0002			0,0045			0,0331			0,0089			0,0391		
CH150	0,0002	0,0003	0,00024	0,0133	0,0132	0,00008	0,0498	0,0501	0,00048	0,0392	0,0390	0,00033	0,0530	0,0530	0,00000
	0,0005			0,0132			0,0505			0,0388			0,0530		
CH151	0,0002	0,0003	0,00007	0,0019	0,0014	0,00076	0,0062	0,0063	0,00022	0,0037	0,0038	0,00015	0,0098	0,0097	0,00007
	0,0003			0,0008			0,0065			0,0039			0,0097		
CH125	0,0003	0,0003	0,00000	0,0062	0,0064	0,00024	0,0109	0,0109	0,00000	0,0067	0,0068	0,00017	0,0218	0,0219	0,00016
	0,0003			0,0066			0,0109			0,0069			0,0220		
CH129	0,0001	0,0003	0,00028	0,0055	0,0062	0,00090	0,0020	0,0019	0,00014	0,0009	0,0021	0,00173	0,0001	0,0001	0,00007
	0,0005			0,0068			0,0018			0,0033			0,0002		
CH141	0,0004	0,0005	0,00007	0,0044	0,0042	0,00032	0,0024	0,0021	0,00042	0,0046	0,0047	0,00014	0,0072	0,0073	0,00013
	0,0005			0,0040			0,0018			0,0048			0,0074		
CH286	0,0005	0,0004	0,00021	0,0029	0,0026	0,00042	0,0104	0,0104	0,00005	0,0087	0,0087	0,00007	0,0135	0,0132	0,00045
	0,0002			0,0023			0,0104			0,0088			0,0128		
CHZ52	0,0005	0,0004	0,00014	0,0032	0,0033	0,00014	0,0126	0,0119	0,00108	0,0065	0,0067	0,00023	0,0163	0,0175	0,00168
	0,0003			0,0034			0,0111			0,0069			0,0187		
CHZ113	0,0006	0,0004	0,00034	0,0021	0,0021	0,00011	0,0049	0,0046	0,00038	0,0061	0,0058	0,00042	0,0082	0,0075	0,00091
	0,0001			0,0020			0,0043			0,0055			0,0069		
CHZ306	0,0004	0,0002	0,00024	0,0166	0,0167	0,00016	0,0401	0,0402	0,00016	0,0255	0,0256	0,00017	0,0328	0,0330	0,00032
	0,0001			0,0168			0,0403			0,0258			0,0332		

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE M - Avaliação da degradação de quitina: Atividade de quitobiosidases pelas bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação e às condições de cultivo pré-determinadas

Isolado	T=0			T=24			T=48			T=72			T=96		
	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão
CH101	0,0003	0,0003	0,00007	0,0026	0,0026	0,00011	0,0015	0,0015	0,00000	0,0034	0,0035	0,00007	0,0028	0,0028	0,00006
	0,0002			0,0025			0,0015			0,0035			0,0029		
CH147	0,0001	0,0002	0,00014	0,0001	0,0003	0,00016	0,0003	0,0002	0,00014	0,0001	0,0002	0,00021	0,0001	0,0002	0,00019
	0,0003			0,0004			0,0001			0,0003			0,0003		
CH149	0,0002	0,0005	0,00040	0,0479	0,0478	0,00008	0,0219	0,0220	0,00008	0,0141	0,0141	0,00008	0,0091	0,0089	0,00024
	0,0007			0,0478			0,0220			0,0142			0,0087		
CH150	0,0002	0,0002	0,00000	0,0336	0,0335	0,00008	0,0171	0,0170	0,00016	0,0166	0,0166	0,00000	0,0152	0,0154	0,00024
	0,0002			0,0335			0,0169			0,0166			0,0156		
CH151	0,0002	0,0003	0,00007	0,0027	0,0025	0,00028	0,0017	0,0018	0,00014	0,0021	0,0020	0,00023	0,0015	0,0015	0,00000
	0,0003			0,0023			0,0019			0,0018			0,0015		
CH125	0,0005	0,0005	0,00008	0,0311	0,0312	0,00008	0,0118	0,0120	0,00032	0,0100	0,0098	0,00017	0,0107	0,0108	0,00024
	0,0004			0,0312			0,0122			0,0097			0,0110		
CH129	0,0002	0,0002	0,00007	0,0022	0,0015	0,00097	0,0008	0,0005	0,00043	0,0007	0,0006	0,00015	0,0003	0,0004	0,00013
	0,0001			0,0008			0,0002			0,0005			0,0005		
CH141	0,0001	0,0001	0,00000	0,0128	0,0125	0,00037	0,0013	0,0015	0,00019	0,0015	0,0015	0,00000	0,0011	0,0012	0,00019
	0,0001			0,0123			0,0016			0,0015			0,0013		
CH286	0,0003	0,0002	0,00014	0,0231	0,0229	0,00032	0,0163	0,0173	0,00131	0,0216	0,0216	0,00000	0,0157	0,0157	0,00000
	0,0001			0,0226			0,0182			0,0216			0,0157		
CHZ52	0,0001	0,0002	0,00007	0,0020	0,0019	0,00021	0,0026	0,0026	0,00007	0,0021	0,0021	0,00000	0,0028	0,0033	0,00067
	0,0002			0,0017			0,0027			0,0021			0,0038		
CHZ113	0,0001	0,0002	0,00007	0,0113	0,0111	0,00026	0,0072	0,0068	0,00052	0,0088	0,0093	0,00070	0,0077	0,0078	0,00019
	0,0002			0,0109			0,0064			0,0097			0,0079		
CHZ306	0,0004	0,0004	0,00000	0,0330	0,0331	0,00016	0,0160	0,0160	0,00000	0,0166	0,0169	0,00041	0,0148	0,0144	0,00049
	0,0004			0,0333			0,0160			0,0172			0,0141		

FONTE: CARDOZO, 2012.

APÊNDICE N - Avaliação da degradação de quitina: Atividade de endoquitinases pelas bactérias quitinolíticas de acordo ao período de incubação e às condições de cultivo pré-determinadas

Isolado	T=0			T=24			T=48			T=72			T=96		
	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão	Atividade (U.mL ⁻¹)	Média	Desvio Padrão
CH101	0,0002	0,0002	0,00000	0,0033	0,0032	0,00005	0,0020	0,0020	0,00005	0,0026	0,0027	0,00014	0,0013	0,0017	0,00058
	0,0002			0,0032			0,0020			0,0028			0,0021		
CH147	0,0002	0,0001	0,00007	0,0008	0,0007	0,00016	0,0001	0,0001	0,00009	0,0002	0,0001	0,00007	0,0006	0,0004	0,00039
	0,0001			0,0006			0,0002			0,0001			0,0001		
CH149	0,0003	0,0002	0,00016	0,0404	0,0402	0,00032	0,0216	0,0218	0,00024	0,0101	0,0102	0,00025	0,0073	0,0076	0,00032
	0,0001			0,0399			0,0219			0,0104			0,0078		
CH150	0,0003	0,0003	0,00008	0,0224	0,0228	0,00064	0,0106	0,0109	0,00032	0,0052	0,0053	0,00017	0,0049	0,0049	0,00000
	0,0002			0,0233			0,0111			0,0054			0,0049		
CH151	0,0004	0,0003	0,00007	0,0023	0,0021	0,00035	0,0017	0,0016	0,00007	0,0013	0,0014	0,00015	0,0027	0,0023	0,00047
	0,0003			0,0019			0,0016			0,0015			0,0020		
CH125	0,0001	0,0002	0,00016	0,0284	0,0285	0,00016	0,0122	0,0123	0,00016	0,0060	0,0061	0,00017	0,0052	0,0052	0,00008
	0,0003			0,0286			0,0124			0,0062			0,0053		
CH129	0,0002	0,0001	0,00007	0,0001	0,0002	0,00014	0,0002	0,0002	0,00000	0,0003	0,0002	0,00015	0,0002	0,0001	0,00007
	0,0001			0,0003			0,0002			0,0001			0,0001		
CH141	0,0002	0,0001	0,00007	0,0115	0,0114	0,00011	0,0025	0,0029	0,00052	0,0018	0,0019	0,00014	0,0010	0,0009	0,00019
	0,0001			0,0113			0,0032			0,0020			0,0007		
CH286	0,0001	0,0001	0,00007	0,0147	0,0150	0,00042	0,0099	0,0099	0,00000	0,0096	0,0098	0,00021	0,0047	0,0047	0,00000
	0,0002			0,0153			0,0099			0,0099			0,0047		
CHZ52	0,0002	0,0002	0,00007	0,0011	0,0012	0,00014	0,0014	0,0016	0,00029	0,0011	0,0011	0,00000	0,0036	0,0031	0,00067
	0,0003			0,0013			0,0018			0,0011			0,0027		
CHZ113	0,0004	0,0003	0,00007	0,0069	0,0071	0,00032	0,0042	0,0043	0,00019	0,0056	0,0056	0,00000	0,0033	0,0034	0,00013
	0,0003			0,0073			0,0045			0,0056			0,0035		
CHZ306	0,0004	0,0006	0,00024	0,0319	0,0321	0,00032	0,0223	0,0224	0,00024	0,0121	0,0121	0,00000	0,0101	0,0102	0,00016
	0,0007			0,0323			0,0226			0,0121			0,0103		

FONTE: CARDOZO, 2012.