

## **DIVERSIDADE CROMOGÊNICA DE ACTINOBACTÉRIAS DO SOLO DE QUIXADÁ - UMA REGIÃO DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Francisca Airlane Esteves de Brito (1); Marcelo de Sousa Pinheiro (2), Suzana Cláudia Silveira Martins (3), Claudia Miranda Martins (4)

1 Graduanda em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Ceará (airlaniaesteves@yahoo.com.br). 2 Doutorando da Pós-graduação em Fitotecnia na Universidade Federal do Ceará (marcelospufc@gmail.com). 3 Professora Universidade Federal do Ceará (suzanac@ufc.br). 4 Professora Universidade Federal do Ceará (claudia.miranda.martins@gmail.com)

### **INTRODUÇÃO**

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas que produzem enzimas extracelulares e importantes metabólitos secundários (GOODFELLOW & WILLIAMS, 1983; HO *et al.*, 2002; VENTURA *et al.*, 2007; GENILLOUD *et al.*, 2011). Esses micro-organismos produzem compostos bioativos importantes de alto valor comercial e, portanto, vem sendo estudado para produção de novas substâncias bioativas, uma vez que 61% de todos os metabólitos microbianos bioativos foram isolados a partir dessas bactérias (MONCHEVA *et al.*, 2002). Esses organismos são importantes em processos biotecnológicos devido à capacidade de produzir metabólitos secundários de diversas classes químicas e atividades biológicas que serão isolados e utilizados para produção de enzimas, agentes antitumorais, imunomoduladores e antimicrobianos (RAJA & PRABAKARANA, 2011).

Um fator importante comum encontrado nesse grupo é a variabilidade de características genéticas, tais como, formação de micélio aéreo, pigmentação, esporulação, resistência a antibióticos e agentes genotóxicos como a mitocina C ou irradiação ultra vermelha e produção de antibióticos (SEMÊDO, 1997). São micro-organismos cosmopolitas, ou seja, com capacidade de colonizar os mais variados ecossistemas, mas o seu habitat principal é o solo (SATHEEJA & JEBAKUMAR, 2011), onde produzem compostos terpenóides responsáveis pelo odor do solo (ENSIGN, 1978). Segundo Arifuzzaman *et al.* (2010), a população de actinobactérias é afetada pela localização geográfica, temperatura e tipo de solo, pH, teor de matéria orgânica, tipo de cultivo, aeração e umidade. Leblanc (2008) relatou que actinobactérias são adaptáveis a habitats como solos com baixo teor de umidade, típico de regiões semiáridas.

Esses micro-organismos produzem pigmentos de cores diversificadas que auxiliam na caracterização cultural dos mesmos (AMSAVENI *et al.*, 2015). A produção de pigmentos não é essencial para o crescimento microbiano, mas desempenha importante papel ecológico, uma vez que contribuem para a sobrevivência e competitividade dos micro-organismos (SHARMA, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Entre os corantes produzidos pelas actinobactérias destacam-se os pigmentos melanóides, polímeros de coloração marrom escura que além de representarem um importante critério taxonômico também se destacam pela similaridade com as substâncias húmicas do solo (DASTAGER *et al.*, 2006). A cor do micélio aéreo e reverso, resultante da produção de pigmentos, é um critério taxonômico determinante para a identificação de actinobactérias (AMAL *et al.*; 2011; AUGUSTINE *et al.*, 2013; MABROUK & SALEH, 2014).

Apesar do grande potencial ecológico e biotecnológico, ainda são escassos os estudos sobre actinobactérias na região semiárida. Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo caracterizar quanto à

diversidade cromogênica e presença de pigmentos melanóides, 30 cepas de actinobactérias oriundas da região semiárida de Quixadá no Estado do Ceará.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Caracterização da área

Foram isoladas 30 cepas de actinobactérias oriundas de amostras de solo da Fazenda Não me deixes uma unidade de conservação localizada no município de Quixadá, Ceará. A propriedade de 929 ha, dos quais 300 ha foram reconhecidos, em 1998, como Reserva Particular de Patrimônio Nacional (RPPN) pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). A localização geográfica é latitude 4°49'34" S e longitude 38° 58'9" W, com 210 m de altitude). O clima do município de Quixadá é classificado como Tropical Quente Semiárido, com pluviosidade média de 732,8 mm, concentrada nos meses de fevereiro a abril, e temperatura média de 26,6 °C (FUNCEME, 2000).

### Preparação das amostras

Para preparação amostras, após homogeneização, foram pesados 10 g de solo e diluídos em 90 mL de solução salina 0,85%. Os frascos foram mantidos sob agitação em mesa agitadora orbital com velocidade de 145 rpm por 30 minutos (correspondentes às diluições  $10^{-1}$ ). A partir destas diluições foram preparadas diluições seriadas até a  $10^{-4}$  (LIMA *et al.*, 2014).

### Contagem de actinobactérias

Determinou-se a população de actinobactérias pelo uso da técnica da semeadura em superfície no meio de cultivo Caseína Dextrose Ágar (CDA) de seguinte composição por litro:  $K_2HPO_4$  0,5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g, glicose 10 g, caseína 0,2 g, nistatina 0,05 mg e pH 6,5-6,6 (KUSTER & WILLIAMS, 1964; ARIFUZZAMAN *et al.*, 2010). O meio foi distribuído em placas de Petri estéreis e 100  $\mu$ L das diluições  $10^{-2}$  até  $10^{-4}$  foram espalhados sobre a superfície das placas, com auxílio de alça de Drigalski, que foram incubadas a  $28 \pm 2$  °C por sete dias (SHAIKH *et al.*, 2013). Após incubação foram selecionadas e quantificadas as diluições que apresentaram entre 30 a 300 colônias com características típicas de actinobactérias e o resultado expresso em UFC  $g^{-1}$  de solo. O ensaio foi realizado em triplicata.

### Cor da massa aérea e pigmento reverso

A avaliação das características das colônias foi realizada a partir do crescimento no meio CDA. Foram selecionadas 30 cepas com características distintas para realização do presente trabalho. Após purificação, cada cepa foi inoculada por estrias em placas de Petri contendo o meio Caseína-Dextrose-Ágar (CDA). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa B.O.D á  $28 \pm 2$  °C por 7 dias. Para descrição das características culturais foram avaliadas as cores do micélio aéreo e reverso das colônias conforme descrito por Wink (2012), baseada na carta de cores (RAL color charts).

### Pigmentos melanóides

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

[www.conidis.com.br](http://www.conidis.com.br)

Para teste de produção de pigmentos melanóides as cepas foram inoculadas em triplicata em meio tirosina ágar (SHINOBU, 1958) de seguinte composição por litro: 15 g glicerol, 0,5 g L-tirosina, 1 g L-asparagina, 0,5 g  $K_2HPO_4$ , 0,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5 g NaCl, 0,01 g  $FeSO_4 \cdot H_2O$  g, 15 g ágar, 1mL solução traços de sais (0,1 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  g, 0,1 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 0,1 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  g, 100 mL água ) e pH 7,2-7,4. Em seguida foram incubadas em estufa B.O.D á  $28 \pm 2$  °C por 7 dias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando as características apresentadas pelas 30 cepas analisadas, utilizando-se como critério de classificação a cor do micélio aéreo e micélio reverso, foram classificados 18 tipos cromogênicos de actinobactérias (Tabela 1). Com relação às cores do micélio aéreo, os pigmentos observados foram cinza (37%), marrom (23%), branco (20%), verde (10%), amarelo (3%), vermelho (3%) e rosa (3%). O micélio reverso apresentou as cores cinza (30%), cinza e branco (10%), amarelo (7%), marrom (14%), creme (14%), marrom e preto (3%), vermelho (10%), marrom e amarelo (3%), rosa (3%), verde (3%) e marrom e cinza (3%) (Figuras 1 e 2).

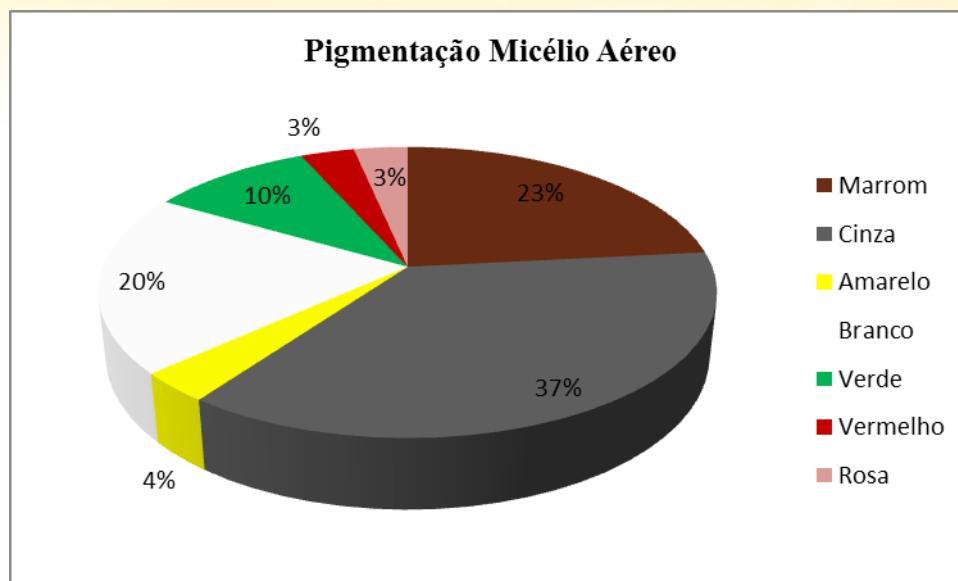
Em estudo sobre a produção de pigmentos produzidos por actinobactérias, Amal *et al.* (2011) relataram que estes pigmentos podem estar dissolvidos no meio ou retidos no micélio e são descritos em tons de azul, violeta, vermelho, rosa, amarelo, verde, marrom e preto.

No bioma Caatinga Silva *et al.* (2013), avaliando as características macroscópicas de 36 cepas de actinobactérias também registraram a predominância da coloração cinza 50% (18), como predominante, seguido de 30,6% (11) com micélio castanho e 19,4% (7) micélio branco. Ramos *et al.* (2015) em análise da diversidade cromogênica de actinobactérias do mesmo bioma, relataram que em 42,8% das cepas não apresentaram a produção de pigmentos. No entanto, o restante das cepas observadas apresentaram pigmentos com predominância das cores branco, seguido do marrom e cinza. No Baixo Acaraú (CE) Silva *et al.* (2015) avaliando as mesmas características para 39 cepas de actinobactérias também constataram a cor cinza, seguida da creme e branco como predominantes tanto no micélio aéreo como no reverso.

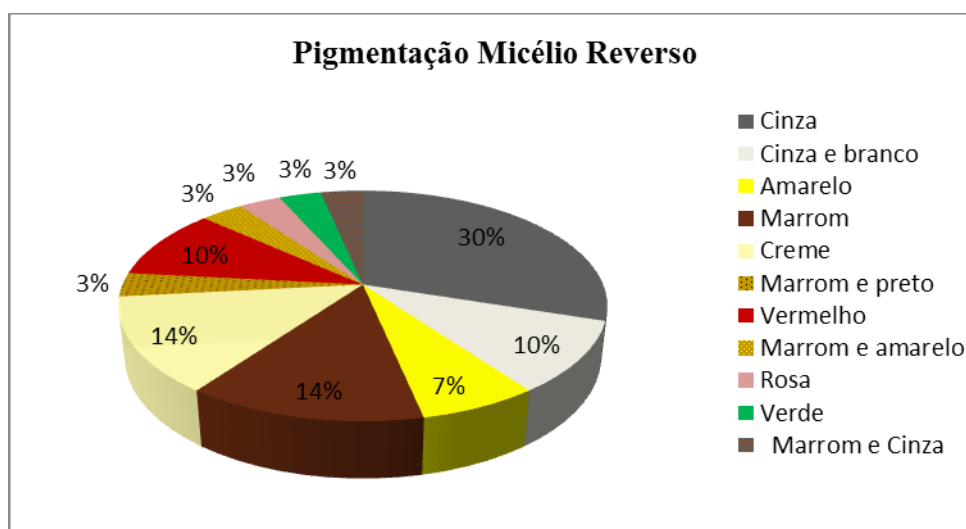
Assim, como no presente trabalho, demais estudos mostraram que as cores cinza, marrom e branca se destacaram como predominantes nas cepas avaliadas. No entanto, vale ressaltar que, mesmo em menor porcentagem, pigmentos de diversas colorações foram observados, sugerindo assim a diversidade cultural das actinobactérias oriundas de regiões do semiárido. Segundo Amal *et al.* (2011), a produção de pigmentos é influenciada por fatores tais como pH, temperaturas e fontes de carbono. Por ser considerada uma região onde predominam altas temperaturas, salinidade, incidência de radiação solar e estresse hídrico, os micro-organismos desse ecossistema representam uma fonte potencial para aplicações biotecnológicas e ambientais (DUAN & FENG, 2010; SOARES Jr., 2012) e a diversidade cromogênica pode estar relacionada às condições adversas do semiárido brasileiro.

**TABELA 1.** Tipos cromogênicos das cepas de actinobactérias

<b>Tipos culturais</b>	<b>Cepas</b>	<b>Micélio aéreo</b>	<b>Micélio reverso</b>
<b>1</b>	Aq 01 Aq 13 Aq 20 Aq 28	Marrom	Cinza
<b>2</b>	Aq 02 Aq 29 Aq 07	Cinza	Cinza e branco
<b>3</b>	Aq 03	Amarelo	Amarelo
<b>4</b>	Aq 05 Aq 17 Aq 30	Cinza	Marrom
<b>5</b>	Aq 08	Cinza	Marrom e preto
<b>6</b>	Aq 09 Aq 10 Aq 24	Branco	Creme
<b>7</b>	Aq 11	Vermelho	Vermelho
<b>8</b>	Aq 12 Aq 32	Verde	Cinza
<b>9</b>	Aq 14	Marrom	Marrom
<b>10</b>	Aq 15	Branco	Marrom e amarelo
<b>11</b>	Aq 16	Rosa	Rosa
<b>12</b>	Aq 18	Marrom	Creme
<b>13</b>	Aq 19 Aq 21 Aq 22	Cinza	Cinza
<b>14</b>	Aq 23	Branco	Amarelo
<b>15</b>	Aq 25	Branco	Vermelho
<b>16</b>	Aq 26	Marrom	Verde
<b>17</b>	Aq 27	Verde	Vermelho
<b>18</b>	Aq 31	Cinza	Marrom e Cinza



**Figura 1:** Cor do micélio aéreo de cepas de actinobactérias da região semiárida de Quixadá.



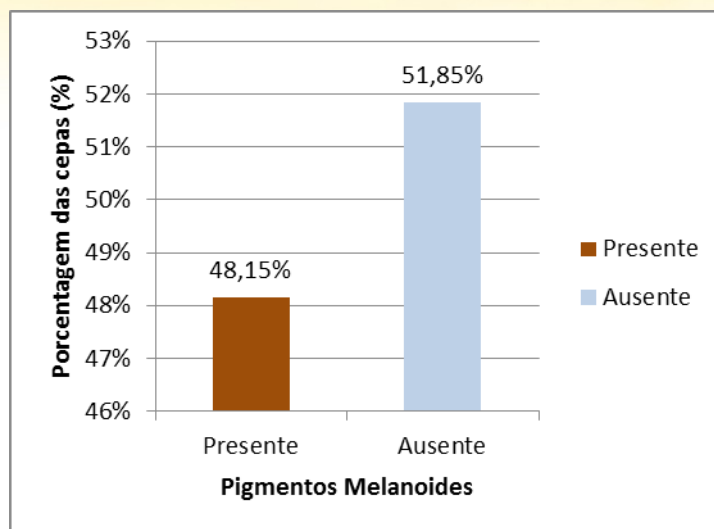
**Figura 2:** Cor do micélio reverso de cepas de actinobactérias da região semiárida de Quixadá.

Actinobactérias também sintetizam e excretam pigmentos escuros de melanina ou melanóide, que são considerados um importante critério para estudo taxonômico (DASTAGER *et al.*, 2006). No presente trabalho, das cepas avaliadas 41,15% foram produtoras de pigmentos melanóides, apresentando as cores marrom escuro, marrom claro e amarelo (Figura 3).

Amal *et al.* (2011) avaliando a produção de melanina para aplicação em indústrias de estampagem e tingimento por *Streptomyces*, registraram que das 30 cepas avaliadas somente quatro (13,3%) exibiram referida característica. Ramos *et al.* (2015) constataram que 21,4% do total das cepas avaliadas, foram produtoras de pigmentos melanóides.

As melaninas são descritas como "armadura" de proteção das actinobactérias contra diferentes situações de estresse ambiental, tais como a radiação ultravioleta e temperaturas extremas (BUTLER & DAY, 1998) condições comuns ao semiárido. Acredita-se que a melanina atua protegendo o micro-organismo contra o estresse ambiental. Bactérias produtoras de melanina também são mais resistentes a





**FIGURA 3** Porcentagem das cepas de actinobactérias produtoras de pigmentos melanóides

antibióticos (LIN *et al.*, 2005). Além de, segundo Miyaura & Tatsumi (1961), produzirem vários tipos de antibióticos e, estes incluem diferentes pigmentos. Portanto, tendo em vista o potencial ecológico e biotecnológico destes micro-organismos, as cepas obtidas no presente estudo representam uma fonte potencial biotecnológica e ecológica.

### CONCLUSÃO

A caracterização realizada no presente trabalho identificou 18 tipos cromogênicos de actinobactérias. As cores cinza, marrom e branco foram predominantes na pigmentação dos micélios aéreo e reverso das 30 cepas avaliadas. As diferentes cores observadas indicaram o elevado grau de diversidade cromogênica das actinobactérias do solo de Quixadá, região do semiárido do brasileiro.

### REFERÊNCIAS

- AMAL, A. M.; ABEER, K. A.; SAMIA, H. M.; ABD EL-NASSER H. N.; AHMED, K. A.; EL-HENNAWI, H. M. Selection of pigment (Melanin) production in *Streptomyces* and their application in printing and dyeing of wool fabrics. **Research Journal of Chemical Sciences**, v.1, n.5, p. 22-28, 2011.
- AMSAVENI, R.; SURESHKUMAR, M.; VIVEKANANDHAN, G.; BHUVANESHWARI, V.; KALAISELVI, M. Screening and isolation of pigment producing Actinomycetes from soil samples. **International Journal of Biosciences and Nanosciences**, v.2, p.24-28, 2015.
- ARIFUZZAMAN, M; KHATUN, M.R.; RAHMAN, H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.4615-4619, 2010.
- AUGUSTINE, D.; JACOB, J. C.; RAMYA, K.D; PHILIP, R. Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal: Biochemical and physiological characterization. **International Journal of Research in Marine Sciences**, v. 2, p.56-63, 2013.

BUTLER, M.J.; DAY, A.W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n.12, p. 1115–1136, 1998

DASTAGER, S. G.; WEN-JUN, L.; DAYANAND, A.; SHU-KUN, T.; XIN-PENG, T.,XIAO-YANG, Z.; LI-HUA, X.; CHENG-LIN, J. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.8, p. 1131-1134, 2006.

DUAN, C.J.; FENG, J.X. Mining metagenomes for novel cellulase genes. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1765-1775, 2010.

ENSIGN, J. C. Formation, properties, and germination of actinomycetes spores. **Annual Review Microbiology**, v.32, p. 185-219, 1978.

FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA – FUNCEME. Climatologia 2000. Disponível em : <[http:// www.funceme.com.br](http://www.funceme.com.br).

GENILLOUD, O.; GONZÁLEZ, I.; SALAZAR, O.; MARTÍN, J.; TORMO, J. R.; VICENTE, F. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.375- 389, 2011.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 189-216, 1983.

HO, C.; LO, C.; LAI, N.; CHEAH, H.; WONG, N. Actinomycetes isolated from soil samples from the cocker range Sabah. **ASEAN Rev. Biodiversity Environmental Conservation**, v. 9, p.1-7, 2002.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selective media for the isolation of *Streptomyces*. **Nature**, v. 202, p. 928-929, 1964.

LEBLANC, J.C.; GONÇALVES, E.R.; MOHN, W.W. **Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1**. Applied Environmental Microbiology, v. 74, p. 2627-2636, 2008.

LIMA, J.V.L.; PINHEIRO, M.S.; FIÚZA, L.M.C.G.; MARTINS, S.C.S.; MARTINS, C.M. Populações microbianas cultiváveis do solo e serapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, p.2300-2316, 2014.

LIN, W. P.; LAI, H. L.; LIU, Y. L.; CHIUNG, Y. M.; SHIAU, C.Y; HAN, J. M.; YANG, C.M.; LIU, Y.T. Effect of melanin produced by a recombinant *Escherichia coli* on antibacterial activity of antibiotics. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**. v.38. n.5, p. 320-326, 2005.

MABROUK, M.I.; SALEH, N.M. Molecular Identification and Characterization of Antimicrobial Active actinomycetes strains from Some Egyptian Soils. **American-Eurasian Journal Agriculture & Environment Science**, v.14, p.954-963, 2014.

(83) 3322.3222

[contato@conidis.com.br](mailto:contato@conidis.com.br)

[www.conidis.com.br](http://www.conidis.com.br)

MIYAURA, J.; TATSUMI, C. Studies on the antibiotics from Actinomycetes. An antibiotics pigment from Streptomyces F- 23b. **Bulletin of the University of Osaka Prefecture. Ser. B, Agriculture and Biology.** v.12, p. 129-137, 1961.

MONCHEVA, P.; TISHKOV, S.; DIMITROVA, N.; CHIPEVA, V.; NIKOLOVA, S. A.; BOGATZEVSKA, N. Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. **Journal of Cultural Collection,** v.3, p.3–14, 2002.

OLIVEIRA, A. P. G.; SABINO, S. M.; GANDINE, S. M.; MOULIN, T.; AMARAL, A. A. Importância das actinobactérias em processos ecológicos, industriais e econômicos. **Enciclopédia Biosfera,** v.10, n.18; p. 3938-3952, 2014.

RAJA, A.; PRABAKARANA, P. Actinomycetes and drugs-an overview. **American Journal of Drug Discovery and Development,** v. 1, n. 2, p. 75-84, 2011.

RAMOS, K. A.; BRITO, F. A. E.; NUNES, K. J. F.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Caracterização e diversidade cromogênica de actinobactérias de um nicho microbiano preservado do bioma caatinga. **Enciclopédia Biosfera,** v. 11, p.2115-2125, 2015.

SATHEEJA SV; JEBAKUMAR SRD. Phylogenetic analysis and antimicrobial activities of Streptomyces isolates from mangrove sediment. **Journal of Basic Microbiology,** v. 51, p.71-79, 2011.

SEMÊDO, L. T. A. S. **Atividade antimicrobiana e celulolítica de actinomicetos isolados de solos brasileiros.** 1997. 128 f Dissertação (Mestrado Biotecnologia Vegetal - Microbiologia Aplicada) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

SHAIKH, N. M.; PATEL, A.A.; MEHTA, S.A.; PATEL, N.D. Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. **Universal Journal of Environmental Research and Technology,** v. 3, n.1, p. 39-49, 2013.

SHARMA, M. Actinomycetes: Source, identification, and their applications. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science.** v.3, n.2, p. 801- 832, 2014.

SHINOBU, R., 1958. Physiological and cultural study for the identification of soil actinomyces species. **Men Osaka University Library Arts Educatin Biology Nature Science,** 7: 1-76.

SILVA, G. L. **Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma Caatinga.** 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA, V.M.A., Lima<sup>1</sup>, J.V.L., de Menezes Gondim, P., Martins, C.M., & Martins, S.C.S . Efeito da irrigação e do tipo de cultivo sobre a riqueza e diversidade

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

**www.conidis.com.br**



cromogênica de actinobactérias do solo de uma região do semiárido do ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p.2965-2979, 2015.

SOARES JR, F.L.; MELO, I.S.; DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D. Cellulolytic bactéria from soils in harsh environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2195-2203, 2012.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the volutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v.71, n. 3, p.495–548, 2007.

WINK, J. M. Compendium of actinobacteria. **University of Braunschweig**. p.1-37, 2012.