

## POTENCIAL AMIOLÍTICO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO SEMIÁRIDO CEARENSE

Kaio Gráculo Vieira Garcia<sup>1</sup>; Diego Sales Lucas<sup>2</sup>; José Evaldo Vasconcelos Carlos<sup>3</sup>; Valéria Maria Araújo Silva<sup>4</sup>; Claudia Miranda Martins<sup>5</sup>.

(<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, kaiovieira88@hotmail.com; <sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará, diego\_slt88@hotmail.com, <sup>3</sup>Universidade Federal do Ceará, evaldocarlos19@hotmail.com, <sup>4</sup>Universidade Federal do Ceará, mariavaleria@yahoo.com, <sup>5</sup>Universidade Federal do Ceará, claudia.miranda.martins@gmail.com)

### INTRODUÇÃO

O solo é um recurso natural vital para o funcionamento do ecossistema terrestre e representa um balanço entre os fatores físicos, químicos e biológicos (LEITE; ARAUJO, 2007). A fração biológica engloba pequenos animais (mesofauna e microfauna) e micro-organismos como bactérias, fungos e algas (ARAUJO; HUNGRIA, 1994).

Grande parte do ciclo do carbono é mediada por micro-organismos que vivem no solo e utilizam o amido. Assim, esses são responsáveis por um dos maiores fluxos de carbono em níveis local e global (LYND *et al.*, 2002). A atividade microbiana é de grande importância para os processos biológicos e bioquímicos, pois influencia diretamente a transformação de nutrientes e compostos orgânicos (MARTENS *et al.*, 1992; VINHAL-FREITAS, 2010).

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas consideradas como um importante componente biológico da maioria dos solos (SEMÊDO *et al.*, 2001; JAYASINGHE; PARKINSON, 2008; SILVA *et al.*, 2012; VELAYUDHAM; MURUNGAN, 2012; SILVA *et al.* 2015). Esse grupo de bactérias possui uma grande semelhança com os fungos, em função de sua produção de hifas, que podem ser curtas, rudimentares e extensivamente ramificadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Outro importante aspecto das actinobactérias está relacionado com a produção de enzimas extracelulares capazes de degradar macromoléculas complexas encontradas no solo, como o amido (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O amido é um polissacarídeo usado como principal reserva energética de plantas superiores, sendo formado pela amilose e amilopectina (NUÑEZ-SANTIAGO *et al.*, 2004).

A capacidade que as actinobactérias possuem em degradar essas substâncias às tornam importantes para o ciclo do carbono melhorando a disponibilidade de nutrientes no solo e conseqüentemente crescimento das plantas (BRITO *et al.*, 2015).

A região semiárida do nordeste brasileiro é caracterizada por apresentar temperaturas superiores a 20 °C, baixas precipitações restritas a 3 ou 4 meses do ano e solos pouco desenvolvidos (ARAÚJO, 2011), o que dificulta a maioria dos processos químicos edáficos. Por outro lado, as

características ambientais limitantes desse ecossistema fazem do mesmo uma excelente fonte para a busca de micro-organismos que sejam eficientes na produção de enzimas, como a amilase, capaz de melhorar a disponibilidade de nutriente nesses ambientes.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi verificar a atividade enzimática amilolítica de actinobactérias isoladas do semiárido cearense.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e isolamento das cepas

Foram analisadas 24 cepas de actinobactérias provenientes de amostras de solos coletadas no município de Quixadá, sertão central do Estado do Ceará, contida na região semiárida. De acordo com o sistema de classificação de Köppen-Geiger o clima da região é caracterizado como BSh - semiárido, seco, com chuvas no verão e seca no inverno (PEEL *et al.*, 2007). As amostras de solo foram coletadas a uma profundidade de 0-20 cm da rizosfera. As cepas foram isoladas e identificadas com a abreviação “AQ” e numeradas em ordem crescente, onde foram mantidas em Caseína Dextrose Ágar (CDA) inclinado a 4 °C no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

### Atividade amilolítica

No teste de amilase as cepas foram inoculadas de acordo com o método de Alariya *et al.* (2013) na forma de spots e em quadruplicata no meio de cultura ágar-amido composto por: peptona (10g), extrato de carne (3g), cloreto de sódio (5g), amido solúvel (2g) e ágar (15g). A solução foi mantida a um pH de 6,5. Após a inoculação as culturas foram incubadas em câmara de crescimento B.O.D.  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 10 dias. Após o crescimento das colônias, foram adicionados 10 mL da solução de lugol nas placas. A produção da enzima amilase foi confirmada pela descoloração do meio de cultura, formando uma zona amarela suave em torno da colônia, em contraste com o meio azul resultante da reação do amido com o iodo. Os diâmetros dos halos e das colônias foram mensurados com paquímetro (mm) colocado no reverso das placas de Petri.

### Índice enzimático

O índice enzimático (IE) foi calculado pela equação:  $IE = Dh/Dc$ . Onde Dh é o diâmetro em milímetros (mm) do halo de hidrólise e Dc o diâmetro em milímetros (mm) da colônia de actinobactérias (FLORENCIO *et al.*, 2012).

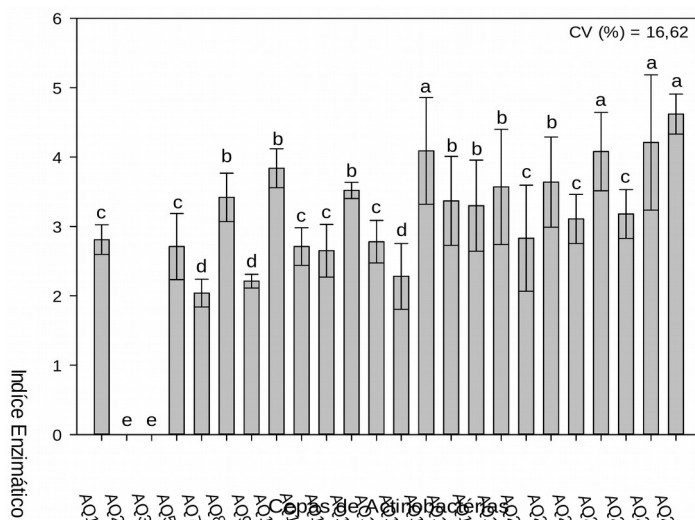
## Analise estatística

Os dados foram submetidos inicialmente ao teste de Kolmogorov-Smirnov (teste de normalidade) a 1% de probabilidade, para verificar se possuíam distribuição normal. Constatada a normalidade, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) que, uma vez significativa, tiveram a aplicação do teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) para comparação de médias, utilizando o software estatístico ASSISTAT versão 7.7 beta (SILVA, 2013).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

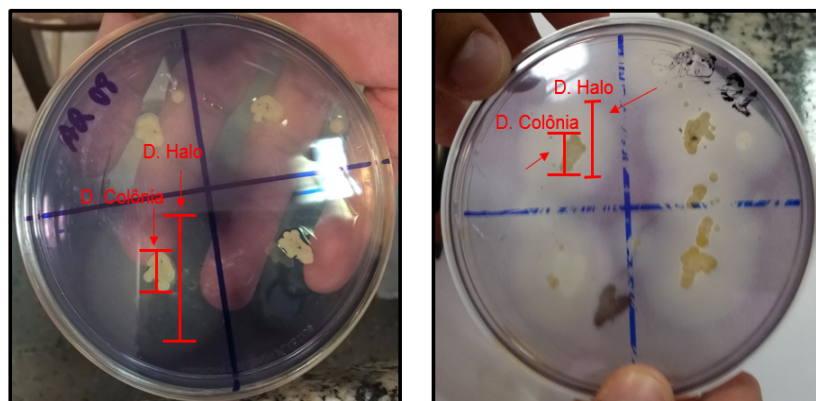
### Índice Enzimático Amilolítico

Os valores do índice enzimático amilolítico das cepas de actinobactérias variaram de 0,00 (zero) (AQ2) a  $4,62 \pm 0,28$  (AQ26). As cepas de actinobactérias AQ26, AQ25, AQ23 e AQ16 destacaram-se por apresentarem um índice enzimático amilolítico superior as demais cepas avaliadas. Apenas as cepas AQ2 e AQ3 não apresentaram atividade enzimática amilolítica (Figura 1).



**Figura 1** – Índice enzimático amilolítico de cepas de actinobactérias isoladas do município de Quixadá, localizado no semiárido do Ceará. Os valores representam a média de quatro repetições  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre as diferentes cepas de actinobactérias, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

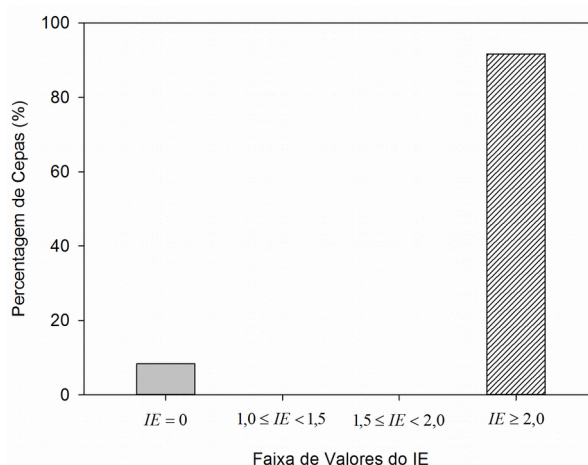
A zona mais clara ao redor das colônias, correspondente ao halo indicador da degradação do amido foi observado em 22 das 24 cepas de actinobactérias estudadas, exemplo da AQ1 e AQ8 (Figura 2).



**Figura 2** – Hidrolise do amido referente as cepas AQ8 e AQ1. D. Halo = diâmetro do halo (mm); D. Colônia = diâmetro da colônia (mm).

De acordo com Silva *et al.* (2015), a literatura não disponibiliza valores de IE que classifiquem os micro-organismos quanto à produção de amilase. Neste sentido, visando suprir uma lacuna na classificação do potencial enzimático, particularmente de cepas de actinobactérias do semiárido brasileiro, estes autores sugeriram a seguinte escala quanto ao índice enzimático:  $IE \geq 2$  = cepas fortemente produtoras de amilase,  $1,5 \leq IE < 2,0$  = cepas moderadamente produtoras de amilase,  $1,0 \leq IE < 1,5$  = cepas fracamente produtoras de amilase.

Neste sentido, levando em consideração esta classificação, de todas as 24 cepas avaliadas no presente estudo, 91,66% destacaram-se por apresentarem uma intensidade de produção de amilase  $\geq 2$ , sendo dessa forma caracterizadas como fortemente produtoras de amilase (Figura 3).



**Figura 3** - Classificação da intensidade de produção de amilase das cepas de actinobactérias isoladas do município de Quixadá-CE, em função do índice enzimático (IE).

Ao estudarem a atividade enzimática amilolítica de actinobactérias no semiárido Silva *et al.* (2015), observaram que 60,7% das cepas de actinobactérias avaliadas foram classificadas como fortemente produtoras de amilase ( $IE \geq 2$ ). Resultados semelhantes também foram observados por



Jaralla *et al.* (2014) ao trabalharem com cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo do Iraque. Esses autores relatam que 80% das cepas avaliadas apresentaram potencial positivo para produção de amilase. Por outro lado, Hata *et al.* (2015) avaliando o potencial de produção dessa enzima hidrolítica por actinobactérias isoladas de um solo com diferentes áreas de cultivo de arroz em Tanjung Karang, uma cidade da Malásia, constaram que das 20 cepas avaliadas 45% apresentaram potencial positivo na produção da enzima amilase.

## CONCLUSÕES

As cepas de actinobactérias AQ26, AQ25, AQ23 e AQ16 destacaram-se por apresentar índice enzimático amilolítico (IEA) superior as demais cepas avaliadas.

As actinobactérias apresentam um grande potencial enzimático na degradação de polissacarídeos complexos, como o amido o que reforça a sua grande importância ecológica na liberação de nutrientes, auxiliando nos ciclos e interações biológicas do semiárido.

## REFERÊNCIAS

ALARIYA, S. S. et al. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. **Archives of Applied Science Research**, v.5, n.1, p. 15-24, 2013.

ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Introdução. In: ARAUJO, R.S. & HUNGRIA, M, eds. *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília, Embrapa, 1994. p.91-120.

ARAÚJO, S. M. S. A região semiárida do nordeste do Brasil: Questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. **Revista Científica da FASETE**, v.5, n.5, p. 89-98, 2011.

BRITO, F. A. E. et al. Actinobactérias do solo rizosférico no bioma caatinga. **Enciclopédia Biosfera**, v.11 n.21, p. 1992-2004, 2015.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. **Enzyme Research**, p.1-7, 2012.

HATA, E. M. et al. In vitro antimicrobial assay of actinomycetes in rice against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and as potential plant growth promoter. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 6, p.821-832, dez. 2015.

JARALLA, E. M. et al. Screening for enzymatic production ability and antimicrobial activity of actinomycetes isolated from soil in Hillah/Iraq. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 42-47, 2014.

JAYASINGHE, B. A. T. D.; PARKINSON, D. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. **Applied Soil Ecology**, v.38, p. 109-118, 2008.

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

**www.conidis.com.br**

LEITE, L. F. C.; ARAÚJO, A. S. **Ecologia microbiana do solo**. Teresina, Embrapa Meio Norte, 2007. 24p. (Documentos/Embrapa Meio-Norte).

LYND L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.4, p.506–577, 2002.

MARTENS D. A.; JOHANSON J. B.; FRANKENBERGER W. T. Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues. **Soil Science**, v. 153, n.1, p.53–61, 1992.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 2006. 2ª ed. 729p.

NÚÑEZ-SANTIAGO, M. C.; BELLO-PÉREZ, L. A.; TECANTE, A. Swelling-solubility characteristics, granule size distribution and rheological behavior of banana (*Musa paradisiaca*) starch. **Carbohydrate Polymers**, v.56, n.1, p.65-75, 2004.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v.11, n.5, p. 439-473, 2007.

SEMÊDO, L. T. A. S. et al. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Microbiological Research**, v. 155, n.4, p.291-299, 2001.

SILVA, F. A. S. Assistat versão 7.7 beta, distribuição gratuita. 2013.

SILVA, K.; CASSETARI, A. S. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 4, p.253-262, 2012.

SILVA, V. M. A. et al. Atividade enzimática de actinobactérias do semiárido. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 4, n. 8, p.560-572, 2015.

VELAYUDHAM, S.; MURUGAN, K. Diversity and antibacterial screening of Actinomycetes from Javadi Hill forest soil, Tamilnadu, India. **Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 2, p.41-46, 2012.

VINHAL-FREITAS, I. C. et al. Microbial and enzymatic activity in soil after organic composting. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p.757-764, 2010.