

## CARACTERIZAÇÃO CULTURAL DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE REGIÃO SEMIÁRIDA EM PENTECOSTE (CE)

Ana Clarice Melo Azevedo de Meneses<sup>1</sup>; Valéria Maria Araújo Silva<sup>2</sup>; Lucas Romão Alves Vasconcelos<sup>3</sup>; Suzana Claudia Silveira Martins<sup>4</sup>; Claudia Miranda Martins<sup>5</sup>

(Universidade Federal do Ceará, ana16clarice@hotmail.com<sup>1</sup>, mariavaleria@yahoo.com.br<sup>2</sup>, fernandogouveia.c@gmail.com<sup>3</sup>, suzana220@gmail.com<sup>4</sup>, claudia.miranda.martins@gmail.com<sup>5</sup>)

### Introdução

As actinobactérias são micro-organismos que apresentam características variadas como produção de micélio aéreo e de pigmentos (SEMÊDO, 1997), incluindo os pigmentos melanóides (AHMED; KEYBA; MOUSSA, 2014; BRITO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2015). Esse grupo microbiano faz parte da microbiota cultivável encontrada no solo rizosférico de leguminosas do semiárido cearense (MARTINS *et al.*, 2014), onde realizam funções relevantes, incluindo a ciclagem de nutrientes (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Outra característica marcante das actinobactérias é a produção de enzimas que degradam substratos orgânicos complexos como o amido e a celulose (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A cor da massa aérea e do lado reverso, produtos da produção pigmentos, é uma ferramenta decisiva à classificação taxonômica desses micro-organismos (MABROUK & SALEH, 2014). Os pigmentos melanóides também representam um importante instrumento na identificação dessas bactérias (ZHU *et al.*, 2007). As actinobactérias capazes de produzir pigmentos carotenóides e melanóides contribuem para o equilíbrio ecológico da microbiota no solo (SILVA, 2016), já que auxiliam na sobrevivência microbiana nesse ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Assim, o presente estudo tem como objetivo a caracterização cultural de cepas de actinobactérias oriundas de Pentecoste, região semiárida do Ceará.

### Metodologia

#### Coleta de solo e amostragem

A área de estudo faz parte da Fazenda Experimental Vale do Curu, no município de Pentecoste (Ceará), localizado a 3° 47' 34" de latitude sul e a 39° 16' 13" de longitude oeste de Greenwich a uma altitude de 60 m. Nessa área o solo é classificado como Neossolo Flúvico (EMBRAPA, 1999).

O solo foi coletado numa profundidade de 0-10 cm, na rizosfera das plantas *Mimosa caesalpiinifolia* Benth. (sabiá), *Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir. (jurema preta), *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz (catingueira), *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud (mororó), *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith (cumaru) e *Bursera leptophloeos* (Mart.) Engl. (imburana).

#### Isolamento das cepas de actinobactérias

As cepas de actinobactérias foram isoladas do solo por meio da técnica de espalhamento em superfície (ANTUNES, 1995) em placas com meio de cultura CDA (Caseinato-Dextrose-Ágar) (CLARK, 1965), em triplicata. Depois de sete dias de incubação em B.O.D. a 28 °C, as colônias com características morfológicas diferentes foram isoladas e purificadas para identificação. No presente estudo foram utilizadas 20 cepas de actinobactérias designadas APE-06, APE-07, APE-10, APE-16, APE-28, APE-29, APE-35, APE-37, APE-41, APE-42, APE-46, APE-54, APE-61, APE-62,

APE-64, APE-66, APE-72, APE-76, APE-77, APE-78. Essas cepas pertencem à coleção de actinobactérias do semiárido, do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará-UFC.

## **Caracterização morfológica e cultural**

### **Coloração de Gram**

A coloração de Gram foi realizada por meio de um esfregaço de cada cepa em uma lâmina. Após a secagem e fixação, o mesmo foi coberto por 1 minuto com solução fenicada de cristal violeta. Posteriormente, o esfregaço foi lavado com lugol, água corrente e álcool 95° GL e, por fim, coberto com solução de fucsina básica durante 30 segundos. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico a um aumento de 1000x (KERN; BLEVINS, 1999).

### **Cor do micélio aéreo e do reverso da colônia**

Depois de purificada, cada cepa foi inoculada em placas de Petri com o meio CDA e incubada em B.O.D a  $28 \pm 2$  °C durante 7 dias. As cores do micélio aéreo e reverso das colônias foram definidas com base na carta de cores (RAL color charts), conforme descrito por WINK (2012).

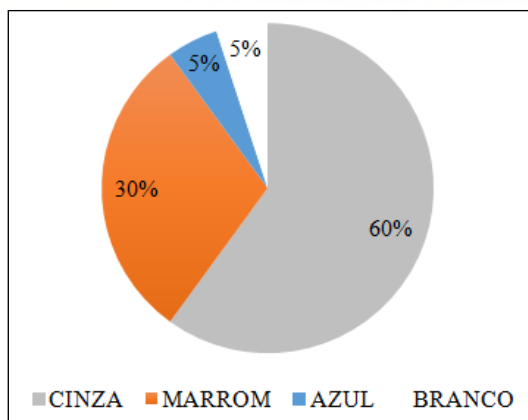
### **Produção de pigmentos melanóides**

O teste de produção de pigmentos melanóides foi realizado de acordo com o método proposto por SHINOBU (1958). As cepas de actinobactérias foram inoculadas em meio com tirosina e meio sem tirosina (controle) e incubadas em B.O.D a  $28 \pm 2$  °C. Depois de 7 dias, verificou-se que houve ausência ou presença de pigmentos melanóides. O aparecimento de pigmento escuro somente no meio com tirosina indica resultado positivo para produção de pigmentos melanóides.

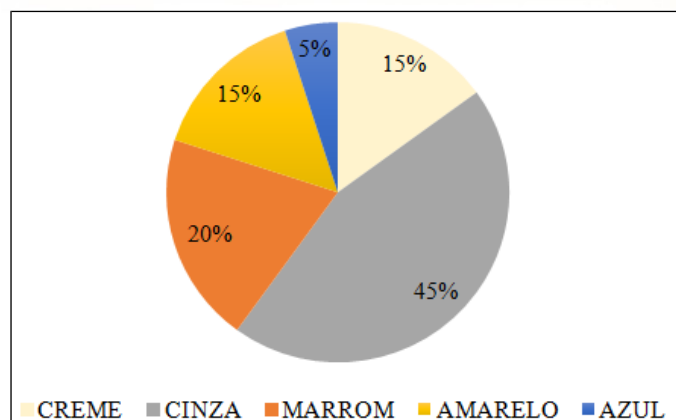
## **Resultados e Discussão**

Todas as cepas apresentaram caráter Gram-positivo, característica comum dessas bactérias (GOODFELLOW; WILLIANS, 1983). Ao analisarem a morfologia celular de 28 cepas de actinobactérias isoladas do solo do Parque Nacional de Ubajara (CE) BRITO *et al.* (2015) verificaram o caráter Gram-positivo de todas as cepas.

No caso do micélio aéreo, predominaram nas cepas as cores cinza (60%) e marrom (30%). Algumas cepas apresentaram micélio aéreo na cor azul (5%) e branco (5%) (Figura 1). Em relação ao lado reverso das colônias foi possível observar as cores amarelo, cinza, marrom, creme e azul, sendo que as cores que prevaleceram foram cinza (45%) e marrom (20%) (Figura 2).

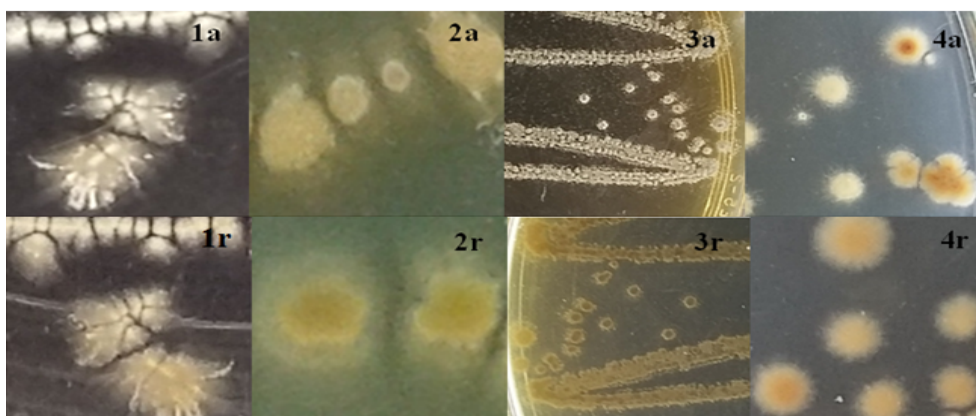


**Figura 1:** Percentual da cor do micélio aéreo de actinobactérias oriundas de Pentecoste, região semiárida do Ceará.



**Figura 2:** Percentual da cor do lado reverso de actinobactérias oriundas de Pentecoste, região semiárida do Ceará.

Na figura 3 pode-se observar a diversidade das cores do micélio aéreo e do lado reverso de colônias de actinobactérias.



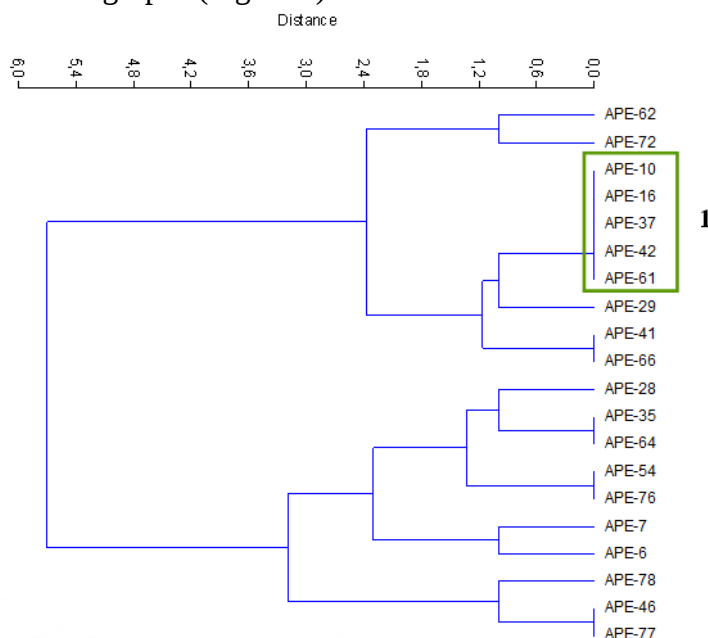
**Figura 3:** Características culturais do micélio aéreo (a) e do micélio reverso (r) de cepas de actinobactérias oriundas de Pentecoste (CE): (1) APE-06, (2) APE-54, (3) APE-07 e (4) APE-76.

O predomínio de cepas com micélio aéreo cinza (60%) e com lado reverso cinza (45%) e marrom (20%) observado na atual pesquisa corrobora com os dados de SILVA *et al.* (2015) que analisaram a diversidade de características culturais, incluindo a cor da massa aérea e do pigmento reverso, de 39 cepas de actinobactérias isoladas de solo coletado em área de caatinga no município de Marco (Ceará). Segundo esses autores, a cor mais frequente da massa aérea foi cinza (49%), enquanto que do micélio reverso foi cinza (30%), creme (30%) e marrom (20%), outras tonalidades foram observadas como azul, verde, amarelo e rosa (massa aérea) e, cinza, creme e marrom (pigmento do lado reverso).

O micélio aéreo e o reverso das actinobactérias alvo do presente estudo apresentaram tonalidades diferentes, semelhante aos dados obtidos por RAMOS *et al.* (2015) ao registrarem a ocorrência de cores diferentes do micélio aéreo (branca, cinza, branca e preta, amarelo-pálida e amarela e preta) e do lado reverso (branco, castanho, rosa, amarelo e cinza) de actinobactérias oriundas do Parque Nacional de Ubajara (CE), indicando o alto grau de diversidade cromogênica dessas bactérias.

Das 20 cepas de actinobactérias testadas, 4 cepas (APE-41, APE-62, APE-66 e APE-72, 20%) produziram pigmentos melanóides. O percentual de 20% de cepas de actinobactérias, produtoras de pigmentos melanóides, analisadas no presente estudo é similar aos resultados obtidos em outros estudos em áreas semiáridas. BRITO *et al.* (2015) analisaram a ausência ou presença de pigmentos melanóides de cepas de actinobactérias e relataram que 17,86% das cepas os produziram. Os dados de RAMOS *et al.* (2015) ao avaliarem 28 cepas de actinobactérias verificaram que 21,4% produziram tais pigmentos.

Com base nas características culturais e na produção de pigmentos melanóides, verificou-se a formação de 12 grupos (Figura 4).



**Figura 4:** Dendrograma das características culturais e produção de pigmentos melanóides das actinobactérias oriundas de Pentecoste (CE)

Dentre os 12 grupos formados, o grupo 1 se destacou em relação aos demais, com o maior número de cepas com a mesma cor do micélio aéreo e do reverso da colônia, além de não produzirem pigmentos melanóides. Observou-se que 4 grupos contêm dois representantes e 7 grupos contêm apenas 1 representante. Esses resultados sugerem a diversidade das cepas de actinobactérias oriundas de Pentecoste.

### Conclusões

A diversidade cromogênica e a capacidade de produzir ou não pigmentos melanóides das cepas de actinobactérias oriundas de Pentecoste, pode ser um indicativo da diversidade desse grupo microbiano que apresenta papel relevante no semiárido.

### Referências Bibliográficas

AHMED, E.S.; KEYBA, H. M.; MOUSSA, L. A. Gamma ray induced effects on new species of *Streptomyces* (AEFO2) (HM775973.1GI:302495616) isolated from Egyptian soil. **International of Journal of Bioassays**, v.3, p.3586-3593, 2014.

ANTUNES, G.S. **Manual de diagnóstico bacteriológico**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 278p.

BRITO, F.A.E.; RAMOS, K.A.; SILVA, R.M.; MARTINS, C.M.; MARTINS, S.C.S. Actinobactérias do solo rizosférico no bioma caatinga. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, p.1992-2004, 2015.

CLARK, F.E. Agarplate method for total microbial count. pp. 1460-1466. In: **Methods of soil analysis** (Black, C.A.; Evans, D.D.; Ensminger, L.E.; White, J.L.; Clark, F.E., eds.) Madison: American Society of Agronomy, 1965.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: Embrapa Produção da Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412 p.

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, E. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 189–216, 1983.

KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica: Texto e Atlas**. São Paulo: Premier, 1999.

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.

MARTINS, C.M.; PINHEIRO, M.S.; FIÚZA, L.M.C.G.; OLIVEIRA, A.V.; MARTINS, S.C.S. Comunidade microbiana cultivável do solo rizosférico de leguminosas no semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, p. 2858-2868, 2014.

MOREIRA, F.M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, 2006.

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.18, p.3938-3952, 2014.

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 no bioma Caatinga. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, p. 2115-2125, 2015.

SEMÊDO, L. T. A. S.; LINHARES, A. A.; GOMES, R.C.; MANFIO, G. P.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Microbiological Research**, v.155, p.291-299, 2001.

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

SILVA, V. M. A.; LIMA, J. V. L.; GONDIM, P. M.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Efeito da irrigação e do tipo de cultivo sobre a riqueza e diversidade cromogênica de actinobactérias do solo de uma região do semiárido do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, p.2965-2979, 2015.

SILVA, V.M.A., 2016. **Facilitação pode incrementar a capacidade de adaptação de actinobactérias e rizóbios “in vitro”**. Dissertação. (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal do Ceará.

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

ZHU, H.; GUO, J.; YAO, Q.; YANG, S.; DENG, M.; PHUONG, L. T. B.; HANH, V. T.; RAYAN, M. T. *Streptomyces vietnamensis* sp. nov., a streptomycete with violet–blue diffusible pigment isolated from soil in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, v.57, p.1770-1774, 2007.