

EFEITO DE ESTRESSE SALINO SOBRE ATIVIDADE AMIOLÍTICA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLO DO SEMIÁRIDO

Karoline Alves Ramos (1); Claudia Miranda Martins (2); Suzana Claudia Silveira Martins (3)

(1) Estudante do curso de graduação de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, karolinea.ramos@gmail.com; (2) Professora Doutora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, claudia.miranda.martins@gmail.com; (3) Professora Doutora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, suzanac@ufc.br

1 INTRODUÇÃO

A região semiárida se caracteriza por solos com baixa disponibilidade de nutrientes e elevadas concentrações salinas (ZANELLA, 2014). Isso pode configurar uma ameaça às comunidades microbianas, pois interfere na liberação de compostos solúveis e limita a capacidade metabólica dos microrganismos (FREITAS *et al.*, 2007). No entanto, as actinobactérias constituem um dos maiores grupos microbianos e estão distribuídas nos mais diversos ecossistemas aquáticos e terrestres, de modo mais abundante em solos (SILVA *et al.*, 2012). Sugere-se relevância desse grupo para a manutenção, sinalização e colonização de diversos ambientes (GONZÁLEZ, 2005). Essas bactérias se destacam ainda pela diversidade enzimática, responsável pela disponibilização de nutrientes a partir da degradação de substratos complexos, porém, segundo Oshone; Mansour; Tisa (2013), situações de estresse, como a salinidade, afeta essas atividades enzimáticas. Dessa forma, tendo em vista a disponibilidade de amido no solo e a influência do estresse salino sobre a atividade enzimática das actinobactérias do semiárido, esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl) na atividade amilolítica de cepas de actinobactérias isoladas de uma região do semiárido brasileiro. Esses estudos são importantes por contribuir para manutenção e recuperação de ecossistemas extremos, como os solos de regiões do semiárido.

2 METODOLOGIA

Utilizaram-se 18 cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com rizóbios deficientes em amilase e com Índice Enzimático (IE) maior que 2, de acordo com Silva (2016). Essas cepas denominadas com código UB-número da cepa, são mantidas em tubos inclinados com meio caseína dextrose ágar (CDA) a 4°C no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do

Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, compondo coleção de actinobactérias de solo do semiárido do Nordeste brasileiro.

Foram adicionadas diferentes concentrações de NaCl (cloreto de sódio) (1,0, 2,0, 3,0 e 4,0%) em meio de cultura ágar-amido, com a seguinte composição por litro: peptona (10,0 g), extrato de carne (3,0 g), NaCl (5,0 g), amido solúvel (2,0 g) e ágar (15,0 g), pH 6,5-7,1 (ALARIYA *et al.*, 2013, modificado). Nesta técnica, as cepas de actinobactérias selecionadas foram inoculadas na forma de *spots* em cada concentração de NaCl anteriormente especificada e incubadas em B.O.D. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 10 dias. Após esse período, foram adicionados em cada placa 10 mL de solução lugol de modo a evidenciar o halo de degradação enzimática, dessa forma o cálculo do Índice Enzimático (IE) caracterizou a atividade amilolítica dessas actinobactérias, por meio da seguinte equação: $IE = Dh/Dc$, na qual Dh é o diâmetro médio em mm do halo de hidrólise e Dc o diâmetro médio em mm da colônia das actinobactérias (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Sendo esse teste realizado em triplicata, com cada repetição constituída por uma placa de Petri, foi obtido um IE médio e o desvio padrão. Esses dados de índice enzimático foram submetidos a uma análise de regressão linear no software gratuito RStudio® (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), com 5% de significância, de forma a modelar a relação entre as variáveis quantitativas.

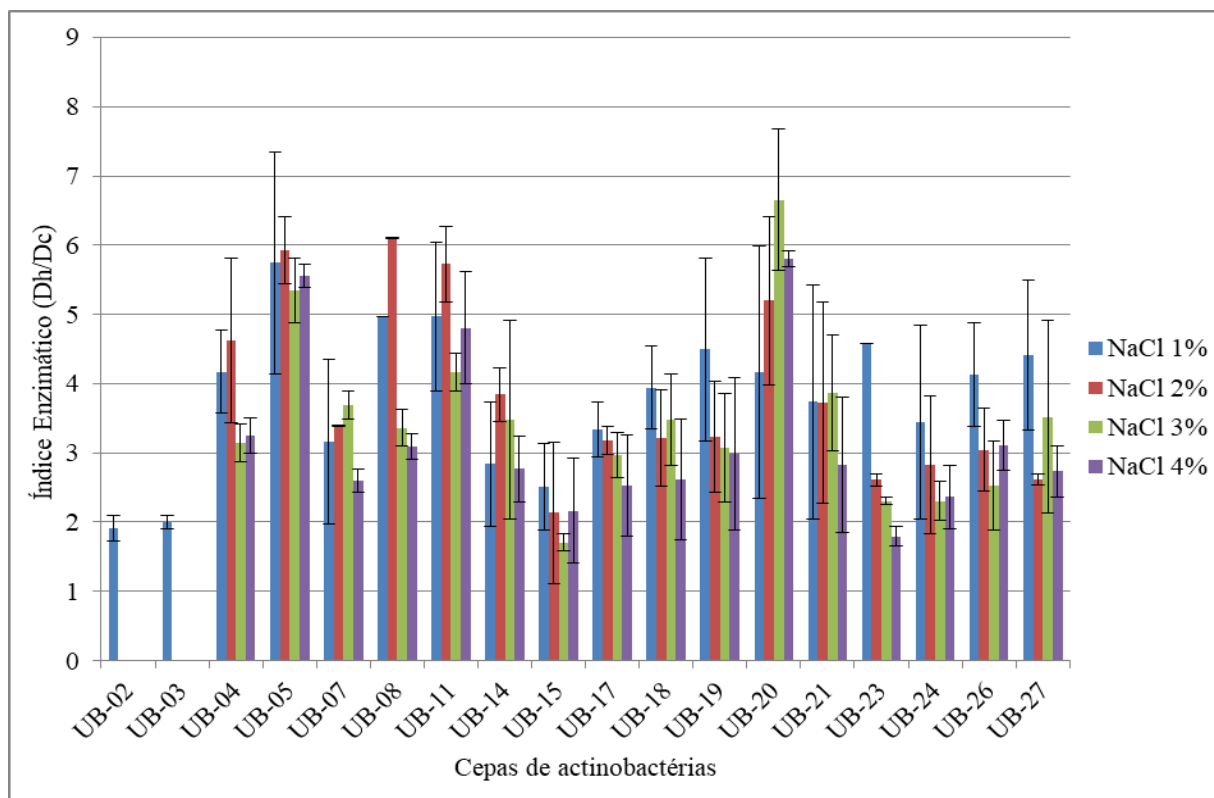
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 18 cepas de actinobactérias cresceram em todas as concentrações testadas. Um fato interessante a se destacar é que as cepas UB-02 e UB-03 cresceram, mas não apresentaram halo de hidrólise nas concentrações NaCl 2%, 3% e 4%, por esse motivo não foi possível calcular o IE. O crescimento dessas cepas pode ser atribuído à presença de peptona como fonte de carbono e energia na composição do meio de cultura, ou mesmo que essas cepas hidrolisaram parcialmente o amido.

Na concentração de 1% de NaCl, todas as cepas foram capazes de crescer e apresentar amilase positiva, evidenciada pelo halo de degradação. O índice enzimático variou de 1,9 para a cepa UB-02 a 5,7 para a cepa UB-05 (Gráfico 1). Além disso, a cepa UB-20 apresentou o maior halo nessa concentração de NaCl e a cepa UB-02, apesar do menor tamanho de colônia, apresentou halo, demonstrando a sua capacidade de degradação dos compostos amilolíticos do meio nessa concentração. Esse resultado reforça a importância do índice enzimático, onde se considera não somente o diâmetro do halo de hidrólise, mas também o tamanho da colônia.

Um percentual de 88,89% das cepas de actinobactérias apresentaram atividade amilolítica na concentração de 2% de NaCl. Os IE das 16 cepas foram superiores a 2,5, tendo a cepa UB-08 o maior IE (6,1) e a UB-15 o menor IE (2,1) (Gráfico 1). Tanto na concentração de 3% de NaCl quanto na concentração de 4%, as maiores concentrações testadas, todas as cepas apresentaram crescimento, sendo que 16 cepas (88,89%) produziram halo de hidrólise. Em 3% de NaCl, apenas a cepa UB-15 apresentou um índice enzimático menor que 2, porém na concentração de 4% de NaCl essa cepa já demonstrou um IE superior. O contrário aconteceu para a cepa UB-23, que mostrou um IE de 2,3 na concentração de 2% NaCl e na concentração de 4% referido parâmetro foi 1,79 (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Perfil da atividade amilolítica das cepas de actinobactérias em diferentes concentrações de NaCl.



Fonte: acervo do autor.

Na literatura não foram encontradas referências a estudos sobre a atividade enzimática de actinobactérias do semiárido em função da salinidade, porém Coronado *et al.* (2000) constataram a maior produção de amilase de uma cultura de *Halomonas meridiana* em meio de crescimento com amido numa concentração de 5% de NaCl. Embora a concentração de NaCl testada neste trabalho tenha sido até 4%, foi possível observar que as cepas de actinobactérias são boas produtoras de amilase, pois, mesmo com as condições impostas, até 88,89% apresentaram atividade enzimática

em todas as concentrações de NaCl testadas. Diante disso, pode-se inferir que essas cepas são tolerantes e aclimatam-se rapidamente aos níveis de salinidade acumulando osmólitos nas células (HAGEMANN, 2010) para assim neutralizarem o baixo potencial osmótico no meio e conseguirem crescer.

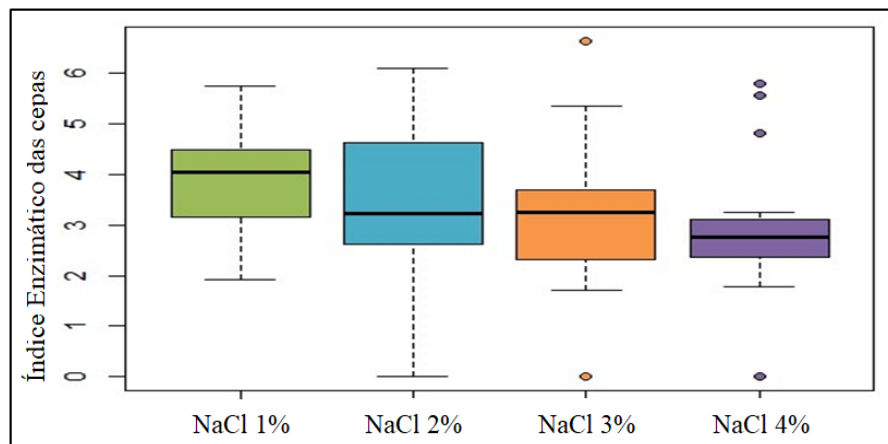
Oliveira *et al.* (2010) relacionaram o comportamento enzimático de rizóbios às condições fisiológicas dos solos da Amazônia, habitat do qual foram isolados. Assim, é possível que a atividade enzimática das cepas de actinobactérias registradas nas condições salinas mais extremas seja referente a um processo adaptativo dessas cepas aos solos salinos da região semiárida.

Os resultados obtidos neste estudo também são importantes do ponto de vista das interações ecológicas. Sousa *et al.* (2008) afirmaram que a salinidade do solo e os níveis de pH são fatores abióticos que podem interferir com a capacidade competitiva dos microrganismos. Assim, a tolerância para alta salinidade pode ser considerado critério para a seleção de microrganismos visando adaptação em solos salinos ou ácidos de forma que os mesmos sejam capazes de realizar suas funções biológicas no ecossistema. Como as cepas de actinobactérias utilizadas foram selecionadas por apresentarem $IE \geq 2,0$ (amilolítico) e interagirem positivamente com cepas de rizóbios (SILVA, 2016), é importante destacar que mesmo nas condições extremas a que foram submetidas *in vitro*, essas actinobactérias continuaram a ter atividade enzimática. Essa característica adaptativa pode contribuir para a permanência e sobrevivência de outros grupos microbianos por mecanismos de cooperação metabólica, como constatada por Silva (2016), entre actinobactérias e rizóbios.

No referido trabalho, a interação metabólica para o amido foi testada em condições ambientais ótimas para os dois grupos de bactérias. Dessa forma, os resultados sugerem que interação continuaria ocorrendo mesmo em condições extremas, e, assim, as actinobactérias poderiam aumentar o *fitness* das bactérias fixadoras de nitrogênio (GOEL *et al.*, 2012) em solos de regiões semiáridas, garantindo a coexistência entre os dois grupos.

A análise de regressão linear mostrou que o teste com NaCl entre as cepas de actinobactérias não apresentou diferença significativa ($p=0.2395$), com $R^2=0,05963$. Esse fato pode ser explicado devido aos *outliers*, que representam os índices enzimáticos das cepas UB-05, UB-11 e UB-20, estarem acima do limite superior do *bloxpot* e as cepas UB-15 e UB-23, abaixo do limite inferior (Gráfico 2). Embora os índices enzimáticos tenham variado de forma não significativa em relação à concentração salina, como supracitado, os maiores índices foram agrupados na concentração de 1 e 2% de NaCl (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Distribuição de índices enzimáticos das cepas de actinobactérias em relação a diferentes concentrações salinas.



Fonte: acervo do autor.

Importante ressaltar que o comportamento enzimático das cepas de actinobactérias é função do ambiente de onde foram isoladas. A esse respeito, Gorchach-Lira e Coutinho (2007) discutem que a reduzida disponibilidade de nutrientes e condições abióticas extremas, prevalentes no semiárido, influencia a atividade bioquímica do solo rizosférico, particularmente a produção de enzimas hidrolíticas, afetando o crescimento, sobrevivência e estruturação das populações microbianas desse ambiente. Porém, os resultados do presente trabalho configuram a presença de enzimas hidrolíticas no solo do semiárido e assim a manutenção de suas funções metabólicas mesmo em condições fisiológicas extremas.

5 CONCLUSÃO

As diferentes concentrações salinas testadas não afetaram negativamente a atividade metabólica das cepas de actinobactérias, dessa forma infere-se que o potencial ecológico que as actinobactérias desempenham no solo, principalmente do semiárido, pode permanecer mesmo com a imposição de um fator fisiológico extremo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BRITO, F. A. E.; RAMOS, K. A.; DA SILVA, R. M. ; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Actinobacteria from rizospheric soil in the caatinga biome. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 1992-2004, 2015.

- CORONADO, M. J. *et al.* Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, n. 1, p. 67-71, 2000.
- FREITAS, A. D. S. *et al.* Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.
- GOEL, A. *et al.* Metabolic shifts: a fitness perspective for microbial cell factories. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 12, p. 2147-2160, 2012.
- GONZÁLEZ, I. *et al.* Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.401-415, 2005.
- GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 135-141, 2007.
- HAGEMANN, M. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. 87-123, 2010.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- OLIVEIRA, A. N.; FLOR, N. S.; OLIVEIRA, L. A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, p. 401-404, 2010.
- OSHONE, R.; MANSOUR, S. R.; TISA, L. S. Effect of salt stress on the physiology of *Frankia* sp strain CcI6. **Journal of Biosciences**, v. 38, n. 4, p. 699-702, 2013.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011) **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>.
- RAMOS, K. A.; BRITO, F. A. E.; NUNES, K. J. F.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Characterization and chromogenic diversity of actinobacteria from undisturbed microbial niche in the caatinga biome. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 2115-2125, 2015.
- SILVA, M. E. *et al.* Brazilian Cerrado Soil Actinobacteria Ecology. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2012.
- SILVA, V. M. A. **Facilitação pode incrementar a capacidade de adaptação de actinobactérias e rizóbios "in vitro"**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 1, p. 50-55, 2008.
- ZANELLA, M. E. Considerations on climate and water resources of the Northeastern semiarid. **Caderno Prudentino de Geografia**, n. 36, p. 126-142, 2014.