

ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO

Fernando Gouveia Cavalcante (1); Érika Oliveira Coelho (2); Juliani Barbosa de Sousa (3); Claudia Miranda Martins (4) Suzana Cláudia Silveira Martins (5)

1 Mestrando na Universidade Federal do Ceará (fernandogouveia.c@gmail.com). 2 Graduanda na Universidade Federal do Ceará (erikacoelho85@gmail.com). 3 Doutoranda na Universidade Federal do Ceará (julianibarbosadesousa@gmail.com). 4 Professora Universidade Federal do Ceará (claudia.miranda.martins@gmail.com). 5 Professora Universidade Federal do Ceará (suzanac@ufc.br)

INTRODUÇÃO

A compreensão e manutenção da biodiversidade tem obtido cada vez mais a atenção dos investigadores sendo importante para a gestão dos recursos naturais. Em comunidades microbianas do solo, a manutenção de espécies que desempenham funções essenciais no solo pode ser mais importante do que a manutenção da diversidade taxonômica (CALDWELL, 2005; TORSVIK & OVREAS, 2002; MARON *et al.*, 2011; KANDELER *et al.*, 1996).

Uma função microbiana essencial para os solos é a ciclagem dos nutrientes que é um processo importante para disponibilização de nutrientes para a maioria dos organismos vivos. Isto requer a atividade de enzimas para processar compostos orgânicos muitas vezes complexos, em assimiláveis (TORSVIK & OVREAS, 2002). O estudo da atividade das enzimas presentes no solo tem sido um campo de interesse científico por mais de um século, mas foi apenas na década dos anos de 1950 que tornou-se um tópico importante de pesquisa em microbiologia do solo e bioquímica (BURNS, 1982; MARX *et al.*, 2001; BURNS *et al.*, 2013).

Essas pesquisas tem focado principalmente nas propriedades fundamentais das enzimas no solo e os dados obtidos a partir dos ensaios enzimáticos são utilizados principalmente, para determinar de forma indireta, a biomassa microbiana do solo, avaliar potencial dos organismos do solo em degradar naturalmente matéria orgânica e compostos xenobióticos. Essas enzimas também tem sido utilizadas como indicadores de efeitos colaterais nocivos dos resíduos contendo metais e pesticidas sobre a microbiota do solo (MARX *et al.*, 2001; KANDELER *et al.*, 1996).

Em estudos ecológicos sobre a relação das enzimas do solo com os diversos eventos ambientais, faz-se necessária a compreensão de todos os fatores relacionados à atividade da enzima na qual está sendo estudada bem como a contribuição de cada componente utilizado para desagregação total do substrato (BURNS, 1982; BURNS *et al.*, 2013).

Entretanto, existem dificuldades consideráveis em se estudar a atividade enzimática do solo *in vitro*, pois esses testes habitualmente envolvem tampões, condições controladas, substratos artificiais ou em excesso, que diferem das condições que ocorrem no ambiente natural. Vale salientar que, algumas das relações sugeridas pelos testes *in vitro* são válidas, embora as propriedades do solo estejam relacionadas com outros fatores que não são possíveis de ser controlados em laboratório (CALDWELL, 2005; BURNS, 1982; BURNS *et al.*, 2013).

As informações obtidas sobre as enzimas do solo têm sido a base para o desenvolvimento de modelos conceituais que fornecem uma compreensão mais abrangente dos processos-chave ligando as populações microbianas e a dinâmica de nutrientes. Além de se avaliar as diferenças entre as atividades

enzimáticas do solo, também é possível com estes ensaios desenvolver medidas específicas de diversidade funcional (WALDROP *et al.*, 2000; KANDELER *et al.*, 1996; NANNIPIERI *et al.*, 2003).

Diferentemente da diversidade fisiológica e genética que avalia o potencial dos micro-organismos do solo, a diversidade funcional das enzimas do solo está relacionada com as atividades reais resultantes desse potencial. Para isso são realizadas medições de atividade enzimática com substratos alvo das principais fontes de nutrientes e identificam-se os diferentes mecanismos de reação às atividades dentro de uma dada função da enzima (BURN *et al.*, 1982; NANNIPIERI *et al.*, 2003).

No solo existem diversos compostos lipídicos complexos e recalcitrantes que não são assimiláveis pela maioria dos organismos vivos. Os micro-organismos que produzem enzimas capazes de quebrar esses lipídios apresentam uma vantagem evolutiva uma vez que esses serão menos afetados pela limitação dos recursos (BURNS *et al.*, 2013; HASAN *et al.*, 2006; ERTUGRUL *et al.*, 2007).

As lipases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol na interface entre a solução aquosa e a fase de lipídeos. Algumas lipases são inespecíficas, catalisando reações em todas as posições em triacilgliceróis, enquanto outros são específicas, catalisando reações em posições específicas sobre as moléculas lipídica. Alguns micro-organismos são conhecidos por terem a capacidade de produzir lipases (KO *et al.*, 2005; HASAN *et al.*, 2006; SIRISHA *et al.*, 2010).

As actinobactérias são de ocorrência universal na natureza e são amplamente distribuídas em ambientes naturais. Esses micro-organismos são encontrados em grandes quantidades nos solos, oceanos, lagos e rios, bem como em resíduos vegetais e são capazes de produzir muitas substâncias bioativas importantes (BASKARAN *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 2012; ASHOKVARDHAN *et al.*, 2014; AMSAVENI *et al.*, 2015).

Devido ao seu papel importante no ecossistema, numerosos estudos ecológicos foram conduzidos com esses micro-organismos que constituem um componente significativo da população microbiana em cada ambiente, especialmente no solo, sendo o principal membro da comunidade decompositora do solo (MOKNI-TLILI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

Alguns dos seus metabólitos secundários são frequentemente utilizados como compostos antimicrobianos e promotores de crescimento de plantas. Além disso, são capazes de sintetizar inúmeros metabólitos naturais com atividade biológica diversificada, tais como antibióticos, herbicidas, pesticidas e enzimas (BASKARAN *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 2012; ASHOKVARDHAN *et al.*, 2014; AMSAVENI *et al.*, 2015).

O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* a capacidade das actinobactérias provenientes de solos do semiárido em utilizar compostos lipídicos.

METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 26 cepas de actinobactérias oriundas de solo rizosférico do Parque Nacional de Ubajara (PNU) no Estado do Ceará. Essas cepas encontram-se mantidas na Coleção de Culturas de Actinobactérias do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

A atividade lipolítica foi avaliada de acordo método descrito por Sierra (1957). Para avaliação de produção da enzima lipase cada cepa foi inoculada, com o auxílio de uma alça de platina, em placas de Petri contendo meio de cultura sólido estéril. O meio de cultura foi suplementado com Tween 80, um ácido graxo de cadeia longa solúvel em água. Foram realizados três ensaios em duplicata além do controle positivo e negativo para comparação dos resultados. Todos os procedimentos ocorreram em condições assépticas.

Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa à 30°C durante 7 dias para avaliar se houve a formação de um halo lipolítico ao redor da colônia, o que caracteriza um efeito positivo. Com o auxílio de um paquímetro foram realizadas leituras dos diâmetros médios, em milímetros, das colônias e dos respectivos halos lipolíticos.

Com esses dados foi realizado o cálculo do índice enzimático das cepas com atividade lipolítica positiva dividindo-se o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia. Para análise estatística foi utilizada a análise de variância com os dados numéricos seguida do teste de Tukey à 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cerca de 84% das cepas de actinobactérias foram capazes de formar o halo lipolítico o que indica a produção de lipase por essas bactérias (Figura 1). Espera-se que um elevado número de cepas de actinobactérias tenha atividade lipolítica positiva, pois dados da literatura mostram que esse grupo de micro-organismos são capazes de produzir diversos metabólitos bioativos incluindo enzimas (STAMFORD *et al.*, 1998; BASKARAN *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 2012; ASHOKVARDHAN *et al.*, 2014; AMSAVENI *et al.*, 2015). Os resultados obtidos nesse estudo reforçam os dados da literatura.

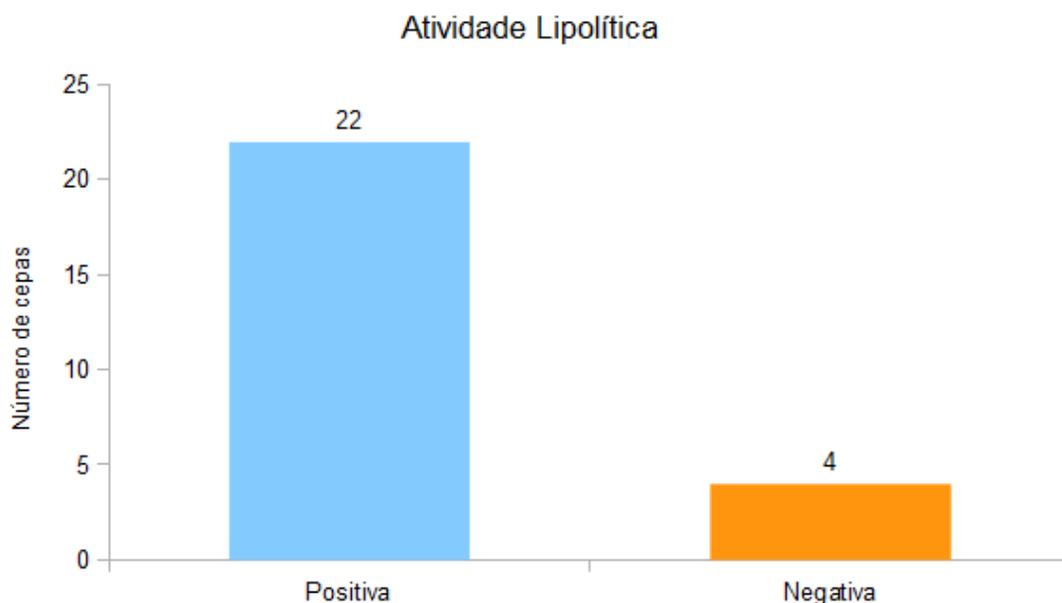


Figura 1-Número de cepas de actinobactérias oriundas do semiárido com atividade lipolítica positiva e negativa

A produção de enzimas extracelulares por esses micro-organismos representa uma vantagem evolutiva, pois os tornam capazes de utilizar uma maior variedade de substratos. Isso pode ser um fator a ser considerado para explicar a ubiquidade dessas bactérias. A atividade lipolítica é um recurso a mais para bactérias de solos do semiárido uma vez que a disponibilidade de substrato nesses solos é limitada (OLIVEIRA *et al.*, 2006a; OLIVEIRA *et al.*, 2006b; SILVA *et al.*, 2015; NAKATANI *et al.*, 2008).

Existem vários métodos para determinar a atividade enzimática por difusão radial em meio de cultura sólido e os fatores que influenciam esta seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos micro-organismos (OLIVEIRA *et al.*, 2006b; STAMFORD *et al.*, 1998).

Apesar dos resultados mostrarem que a maioria das cepas obtiveram atividade lipolítica positiva, alguns autores recomendam a atribuição do índice enzimático, que é calculado a partir dos diâmetros médios do halo e da colônia no meio de cultura. Esse índice mede a capacidade do micro-organismo produzir enzimas extracelulares suficientes para se difundir em meio sólido que deve ser igual ou superior a 2,0 (OLIVEIRA *et al.*, 2006b; STAMFORD *et al.*, 1998).

No presente estudo, os índices enzimáticos para a atividade lipolítica variaram significativamente (5%) entre as diferentes cepas de actinobactérias. Pode-se observar que 86% das cepas apresentaram índice enzimático superior a 2,0 o que confirma a capacidade dessas bactérias em produzir enzimas lipolíticas no meio sólido (Figura 2). Desse modo as cepas com índice enzimático inferior a 2,0 foram consideradas como não produtoras de lipase.

Dentre as 19 cepas que tiveram o índice enzimático superior a 2,0, destacam-se a UB07 e UB23 com índices de 3,02 e 3,26 respectivamente, e a UB20 com índice enzimático de 4,43.

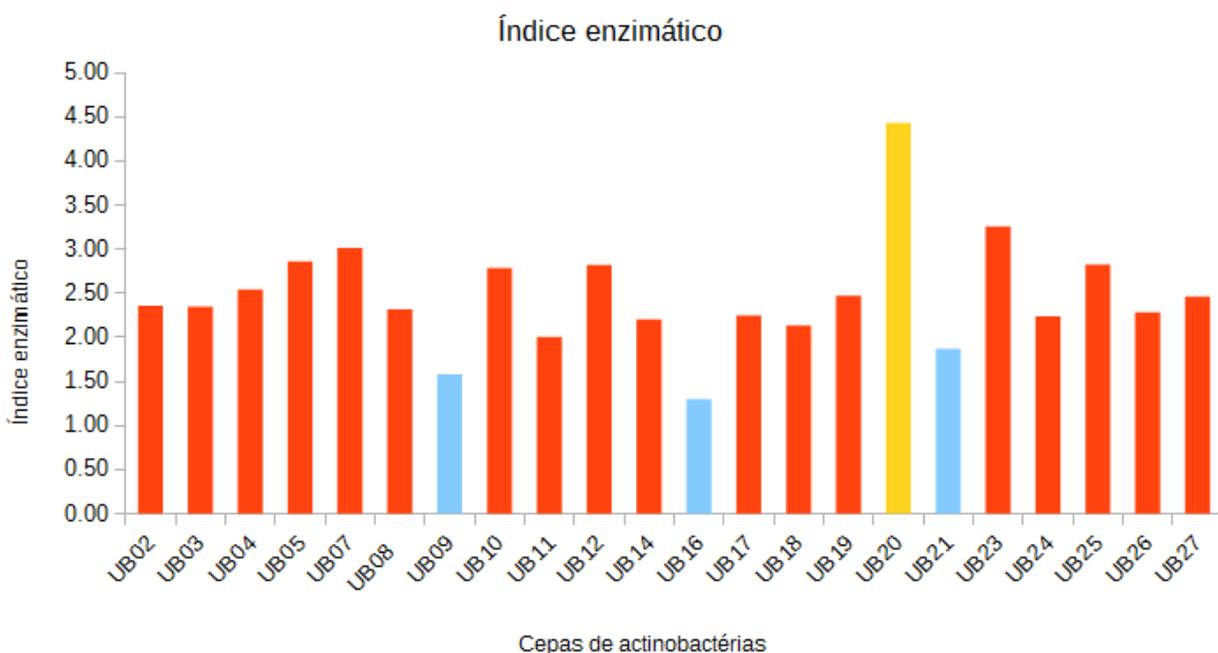


Figura 2—Índice enzimático da atividade lipolítica das cepas de actinobactérias oriundas do semiárido.

De acordo com os dados obtidos é possível dividir as 26 cepas de actinobactérias em 4 grupos distintos considerando seu potencial em degradar lipídeos. O primeiro grupo contém 7 cepas que apresentaram atividade lipolítica negativa. O segundo grupo conta com 16 cepas com índice enzimático variando de 2,0 a 3,0. O terceiro e o quarto grupo contam com 2 e 1 cepas de actinobactérias com índice enzimático variando de 3,0 a 4,0 e maior que 4,0 respectivamente.

CONCLUSÕES

Actinobactérias isoladas de solos do semiárido apresentaram atividade lipolítica positiva.

As cepas UB07, UB20 e UB23 destacaram-se dentre as demais quanto ao índice enzimático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMSAVENI, R. *et al.*, 2015. Screening and isolation of pigment producing Actinomycetes from soil samples. *International Journal of Biosciences and Nanosciences*, v.2, n. 2, p.24-28.
- ASHOKVARDHAN, T.; RAJITHASRI, A. B.; PRATHYUSHA, P.; SATYAPRASAD, K., 2014. Actinomycetes from *Capsicum annum* L. rhizosphere soil have the biocontrol potential against pathogenic fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, v.3, n.4, p. 894-903.
- BASKARAN, R. *et al.*, 2011. Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian Journal of Microbiology*, v.7, n.1, p.26-32.
- BURNS, R. G. 1982. Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, v.14, p.423-427.
- BURNS, R. G. *et al.*, 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, v.58, p.216-234.
- CALDWELL, B. A. 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia*, v.49, p.637-644.
- ERTUGRUL, S. *et al.*, 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, v.149, p.720-724.
- HASAN, F. *et al.*, 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and microbial technology*, v.39, p.235-251.
- KANDELER, F. *et al.*, 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils*, v.23, p.299-306.
- KO, W. H. *et al.*, 2005. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.37, p.597-599.
- MARON, J. A. *et al.*, 2011. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies*, v. 334, p. 403-411.
- MARX, M. C. *et al.*, 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v.33, p.1633-1640.
- MOKNI-TLILI, S. *et al.*, 2013. Antagonistic interactions among cultivable actinomycetes isolated from agricultural soil amended with organic residues. *African Journal of Microbiology Research*, v.7, n.26, p.3304-3320.

- NAKATANI, A. S. *et al.*, 2008. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de “landfarming” de resíduos petroquímicos. *Revista brasileira de ciências do solo*. v.32, 1501-1512.
- NANNIPIERI, P. *et al.*, 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of soil science*, v.54, p.655-670.
- OLIVEIRA, A. N. *et al.*, 2006a. Atividade enzimática de isolados de rizóbio nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, n.1, p.204-210.
- OLIVEIRA, A. N. *et al.*, 2006b. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbio nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.4, p.853-860.
- RAO, K. V. R., *et al.*, 2012. Antagonistic activities of actinobacteria from mangrove sediment. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.4, p.364-367.
- SIERRA, G. *et al.*, 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*. v.23, n.1, p.15-22.
- SILVA, V. M. A. *et al.*, 2015. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. *Enciclopédia Biosfera*, v.11, n.21 p. 2026-2036.
- SIRISHA, E. *et al.*, 2010. Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advances in Biologic Research*, v.4, n.5, 249-252.
- STAMFORD, T. L. M. *et al.*, 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.18, n.4. 382-385
- TORSVIK, V.; OVREAS, L., 2002, Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. v. 5, p. 240-245, 2002.
- WALDROP, M. P. *et al.*, 2000. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry*. v.32, n.13, p.1837-1846.