

EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ACTINOBACTÉRIAS 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, karoline.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

O semiárido configura-se como uma região com grande diversidade de ambientes, em que é possível observar heterogeneidade de vegetações, clima quente e seco, plantas que se adaptam bem a diversas condições ambientais, além de amplitudes térmicas elevadas e solos pouco úmidos (KAVAMURA *et al.*, 2013). Gorch-Lira e Coutinho (2007) descreveram que os microrganismos no solo são influenciados por diversos fatores químicos e físicos, que incluem a disponibilidade de nutrientes, matéria orgânica, umidade e temperatura do solo, dessa forma, em ambientes áridos, todos esses fatores são geralmente desfavoráveis para o crescimento microbiano. Porém, as actinobactérias destacam-se por possuírem ampla capacidade adaptativa a condições ambientais hostis (BERNARDES; SANTOS, 2006) e representam um dos maiores grupos bacterianos, especialmente em solos alcalinos e ricos em matéria orgânica (MARTINS *et al.*, 2014).

O gênero *Streptomyces* é o principal representante das actinobactérias, sendo 95% das cepas de actinobactérias isoladas do solo (SEMÊDO *et al.*, 2001), onde hidrolisam polissacarídeos e outras macromoléculas naturais importantes para a ecologia do solo (CHATER *et al.*, 2010). Dessa forma, a produção de metabólitos secundários em diferentes ecossistemas é uma característica marcante das actinobactérias (MANIVASAGAN *et al.*, 2010). Entre esses metabólitos, destacam-se as enzimas extracelulares, como a amilase, que auxilia na sobrevivência de plantas, no controle de patógenos e disponibiliza nutrientes que facilitam a permanência no solo de outros grupos microbianos (PALANIYANDI *et al.*, 2014; PANDE *et al.*, 2014).

No entanto, a estabilidade enzimática varia com as condições ambientais, segundo Gupta *et al.* (2003), o pH do meio de crescimento, além de interferir na atividade enzimática, induz alterações morfológicas nas cepas. Assim, sabendo-se que a atividade da amilase pode ser afetada por fatores abióticos, como o pH, é importante determinar em que valores essa atividade ainda é detectada.

2 METODOLOGIA

Foram avaliadas 18 cepas de actinobactérias denominadas com código (UB-número da cepa), que estão 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 oriundas do semiárido do Nordeste brasileiro. A atividade amilolítica dessas cepas foi previamente avaliada, o Índice Enzimático (IE) estabelecido e aquelas com $IE \geq 2,0$ foram testadas quanto atividade sinérgica com cepas de rizóbios isoladas da mesma área, mas deficientes na produção de amilase (SILVA, 2016). A partir disso as cepas de actinobactérias UB-02, UB-03, UB-04, UB-05, UB-07, UB-08, UB-11, UB-14, UB-15, UB-17, UB-18, UB-19, UB-20, UB-21, UB-23, UB-24, UB-26 e UB-27 metabolicamente compatíveis com as de rizóbios foram testadas quanto à capacidade de crescimento em meios de cultura contendo amido, com alterações do pH.

Segundo a metodologia de Alariya *et al.* (2013) para atividade amilolítica, as cepas de actinobactérias selecionadas foram inoculadas na forma de *spots* e em triplicata no 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), porém com o pH ajustado para 4, 5, 7 e 9, e incubadas em câmara de crescimento B.O.D. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 dias, após isso foram adicionados 10 mL de solução lugol em cada placa para evidenciar o halo de degradação da enzima. Para expressar a atividade amilolítica nos pHs testados calculou-se o índice enzimático (IE), utilizando-se a equação $IE = Dh/Dc$. Sendo Dh o diâmetro médio em mm do halo de hidrólise e Dc o diâmetro médio em mm da colônia das actinobactérias (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

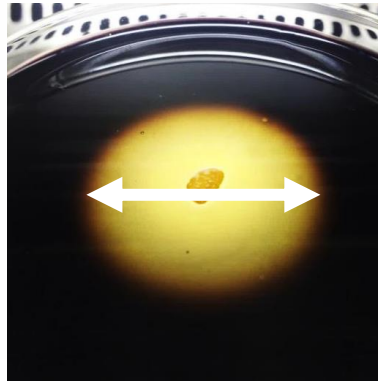
Foi realizado um ensaio em triplicata, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, em que foi obtido um IE médio, além do desvio padrão. Os dados de índice enzimático foram submetidos a uma análise de regressão linear no software gratuito RStudio® (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), com 5% de significância, que modelou a relação entre as variáveis quantitativas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhuma cepa de actinobactéria se desenvolveu no meio suplementado com amido no pH 4, dessa forma não foi possível calcular o índice enzimático. Já no pH 5, 6 cepas (33,33%) foram capazes de crescer e apresentar amilase positiva, com valores do índice enzimático na faixa de

1,5>IE<5. Nesse pH foi possível registrar que a cepa UB-20 apresentou o maior halo de hidrólise (30,68 mm) (Figura 1).

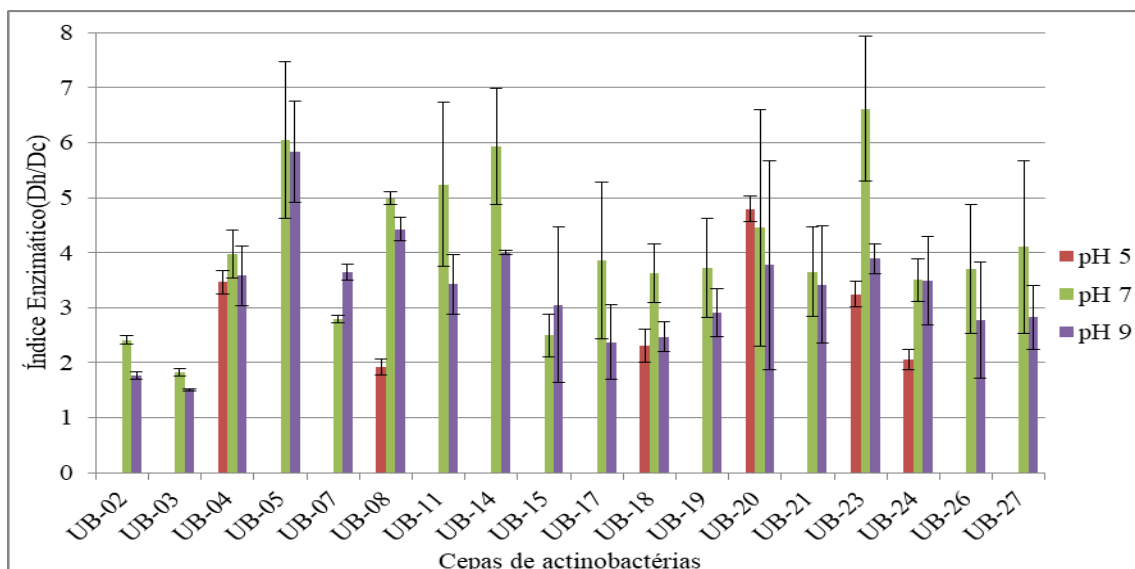
Figura 1 – Halo de hidrólise pela amilase da cepa UB-20 no pH 5. A seta dupla indica o diâmetro do halo.



Fonte: acervo do autor.

Nos pHs 7 e 9 todas as cepas apresentaram amilase positiva, destacando-se as cepas UB-23, com um índice enzimático maior que 6 no pH 7, e as cepas UB-05 e UB-08, com valor maior que 4, mesmo com o aumento do pH. Além disso, é possível observar que o índice enzimático nos diferentes pH variou de 1,5 a 6,7, sendo o menor IE registrado no pH 9 e o maior IE no pH 7 (Gráfico 1), podendo esse maior IE ser atribuído ao pH ótimo de crescimento das actinobactérias ser na faixa de neutralidade (BARKA *et al.*, 2016).

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



Fonte: acervo do autor.

Conforme Ramos *et al.* (2015) e Brito *et al.* (2015) em experimentos sobre as características culturais e micromorfológicas, *Streptomyces* representa 55,56% dos gêneros das cepas de

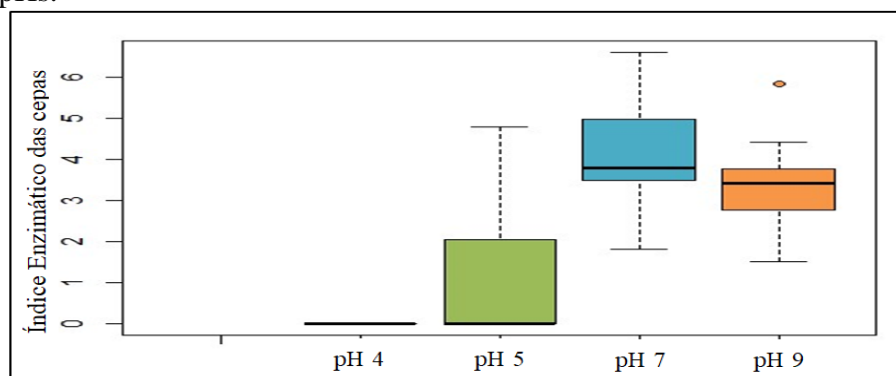
actinobactérias deste estudo. Dessa forma, além do seu conhecido potencial enzimático, os resultados do presente trabalho mostram que esse gênero tolera uma ampla faixa de pH sem perder a capacidade de crescer, principalmente com uma suplementação do meio (KONTRO *et al.*, 2005), isso explica o fato de que mesmo com valores tão extremos de pH ainda foi possível observar crescimento e atividade enzimática, justamente pelo meio conter amido.

Pode-se observar que, apesar das actinobactérias serem capazes de colonizar ambientes extremos, como por exemplo, caracterizados por pHs ácidos ou alcalinos (ZENOVA; MANUCHAROVA; ZVYAGINTSEV, 2011), a atividade amilolítica não foi constatada no pH mais ácido testado, no entanto apresentaram crescimento acentuado nos demais pHs.

Sanomiya e Nahas (2003), estudando a influência do pH nas atividades enzimáticas dos microrganismos, constataram que o pH do solo afetava a frequência de bactérias amilolíticas, enquanto Maccheroni Jr.; Araújo; Azevedo (2004), verificaram que em meio solidificado, a produção de amilase por isolados de *Colletotrichum* obedecia a um padrão dependente do pH ambiental.

A análise de regressão linear mostrou que as alterações do fator abiótico testado teve efeito significativo no índice enzimático das cepas de actinobactérias, sendo $R^2=0,6916$, $p<0,05$. Os maiores índices enzimáticos foram registrados no pH 7 (Gráfico 2), próximo a faixa de pH ótimo para o crescimento dessas actinobactérias. Embora se tratando de outro grupo bacteriano, Oliveira (2006) concluiu que, embora a atividade amilolítica de cepas de rizóbios tenha variado em função do pH do meio, os maiores índices foram registrados em pH 6,5.

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



Fonte: acervo do autor.

Como especificado por Sudharhsan *et al.* (2007), os resultados deste trabalho confirmaram a importância dos fatores abióticos na síntese e secreção de amilases microbianas. Assim, a atividade amilolítica configura um indicativo da presença de enzimas hidrolíticas no solo do semiárido

Nordestino, mesmo em condições abióticas extremas, características dessa região (GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007).

4 CONCLUSÕES

As actinobactérias oriundas do semiárido Nordeste apresentaram atividade amilolítica mesmo sob variações de pH, o que implica na disponibilização de nutrientes e energia necessários para manutenção de processos químicos e biológicos desse ecossistema mesmo em condições abióticas de estresse.

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.
- BARKA, E. A. *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.
- BERNARDES, C. M. *et al.* População microbiana como indicadora de interferência de diferentes manejos de solos de cerrado com cultivo de soja. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 2, 2006.
- 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.
- CHATER, K. F. *et al.* The complex extracellular biology of Streptomyces. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 171-198, 2010.
- 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.
- GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003.
- 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.
- KAVAMURA, V. N. *et al.* Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PLoS one**, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.
- KONTRO, M. *et al.* pH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 32-38, 2005.

MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 298-302, 2004.

MANIVASAGAN, P. *et al.* Isolation, identification and characterization of multiple enzyme producing actinobacteria from sediment samples of Kodyakarai coast, the Bay of Bengal. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 14, p. 1550-1559, 2010.

MARTINS, S. C. M. *et al.* Effect of the rest on the recovery of a soil under caatinga of the Brazilian semiarid. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 2194-2204, 2014.

OLIVEIRA, A. N. *et al.* Enzymatic activity of native Central Amazonian rhizobia strains grown in different levels of acidity. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 26, n. 1, p. 204-210, 2006.

PALANIYANDI, S. A. *et al.* *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 766-773, 2014.

PANDE, S. *et al.* Fitness and stability of obligate cross-feeding interactions that emerge upon gene loss in bacteria. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, 8: 953-962, 2014.

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.

SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Hydrolases producers microorganisms involved in the soil carbon and nitrogen cycling. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 835-842, 2003.

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

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.

SILVA, V. M. A.; BRITO, F. A. E.; RAMOS, K. A.; DA SILVA, R. M.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Enzymatic activity of actinobacteria from semiarid. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 560-572, 2015.

SUDHARHSAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; RANJITH, K. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 430-435, 2007.

ZENOVA, G. M.; MANUCHAROVA, N. A.; ZVYAGINTSEV, D. G. Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil typis. **Eurasian Soil Science**, v. 44, p. 417-436, 2011.