



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JESSICA BARROS ARRAIS CRUZ LOPES

PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES POR
ACTINOBACTÉRIAS ORIUNDAS DO SOLO E SERRAPILHEIRA DE REGIÃO
SEMIÁRIDA

Fortaleza

2017

JESSICA BARROS ARRAIS CRUZ LOPES

PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES POR
ACTINOBACTÉRIAS ORIUNDAS DO SOLO E SERRAPILHEIRA DE REGIÃO
SEMIÁRIDA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Claudia Miranda Martins.

Fortaleza

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L853p Lopes, Jessica Barros Arrais Cruz.

Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por actinobactérias oriundas do solo e serrapilheira de região semiárida / Jessica Barros Arrais Cruz Lopes. – 2017.
27 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Claudia Miranda Martins.

1. Caatinga. 2. Amilase. 3. Celulase. I. Título.

CDD 570

JESSICA BARROS ARRAIS CRUZ LOPES

PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES POR
ACTINOBACTÉRIAS ORIUNDAS DO SOLO E SERRAPILHEIRA DE REGIÃO
SEMIÁRIDA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas do Departamento de Biologia da
Universidade Federal do Ceará como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Claudia Miranda
Martins.

Aprovada em: 14/12/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Claudia Miranda Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof.^a Dr.^a Suzana Cláudia Silveira Martins
Universidade Federal do Ceará

Ma. Valéria Maria Araújo Silva
Universidade Federal do Ceará

Mé. Fernando Gouveia Cavalcante
Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos alcançadas esse ano, pela força e paciência durante todas as dificuldades.

A meus pais, Daniela, Nelson e Flávio, que me aceitam do jeitinho que sou, que sempre me incentivam a melhorar, que sempre tentam me ajudar, mesmo quando não tem a menor ideia como, que me apoiam nas decisões, que enfrentam qualquer um por mim, e que me ensinam como ser uma pessoa melhor e são meu fãs de carteirinha.

A orientadora, Cláudia, pelos ensinamentos, pelas palavras de conforto e incentivo durante esses dois anos de orientação.

Aos meus irmãos, Anna Cecília, Matheus, Lia, Fernanda e Gabriel, são uma fonte de incentivo para que eu me torne um bom exemplo para eles.

A meus padrinhos e seus cônjuges, Cândida e David, exemplos de pessoas e profissionais, por seus conselhos, ensinamentos e incentivos.

Aos meus avós, Cláudia, Luiz, Fafá, Flávio, Perpétua, meus segundos pais, pelo enorme amor e incentivo que sempre me dão.

Ao meu namorado, Rodrigo, que com uma enorme paciência me aturou, me incentivou a melhorar e me apoiou em todas as decisões.

A meus tios e primos, pelo amor e carinho durante todo esse processo.

A todos do LAMAB, que me acolheram e fizeram do ambiente de trabalho um lugar maravilhoso. Agradeço principalmente à Valéria, Juliani e Fernando pelos inúmeros ensinamentos e disponibilidade de responder às minhas intermináveis perguntas.

Ao pessoal da Anatomia Vegetal, pela amizade e por estarem sempre prontos para me confortar com um abraço ou com uma história engraçada.

Aos meus amigos, grandes presentes da minha vida que me ajudam a relaxar, refletir e melhorar como profissional e pessoa.

RESUMO

As actinobactérias são micro-organismos que produzem uma notável variedade de metabólitos secundários. Dentre esses produtos, as enzimas se destacam devido à sua ampla aplicabilidade biotecnológica e industrial. Além disso, essas bactérias são responsáveis por importantes interações ecológicas presentes nos solos. Analisou-se e comparou-se a produção de enzimas hidrolíticas, amilase e celulase, em 58 cepas de actinobactérias provenientes do solo e serrapilheira coletadas na Estação Ecológica de Aiuaba (Ce). No teste amilolítico, 98,27% das cepas, apresentaram halo de degradação. No teste celulolítico, 75,86% das cepas, demonstraram halo de degradação. Os testes estatísticos realizados demonstraram que não houve diferença significativa na atividade enzimática das cepas do solo e serrapilheira. Concluiu-se que houve maior produção da enzima amilase que da enzima celulase, verificou-se maior presença de actinobactérias produtoras de enzima no solo que na serrapilheira.

Palavras-chave: caatinga, amilase, celulase.

ABSTRACT

The actinobacteria are microorganisms that produce a remarkable variety of secondary metabolites. Among these products, enzymes stand out due to their wide industrial and biotechnological application. Besides that, these bacteria are responsible for important ecological interactions in soil. It was analyzed and compared the production of hydrolytic enzymes, amylase and cellulase, in 58 strains of actinobacteria native from soil and litter collected from Estação Ecológica de Aiuaba (Ce). At the amylolytic test, 98,27% of the strains demonstrated degradation halo. The cellolytic test showed that 75,86% from the strains reveal degradation halo. The statistic tests showed no significant difference of enzymatic activity of hydrolytic enzymes between soil and litter. It was concluded that there was a higher production of the amylase enzyme than the cellulase enzyme and there was a greater presence of actinobacteria producing enzyme in the soil than in the litter.

Keywords: caatinga, amylase, cellulase.

Sumário

1 Introdução	8
2 Revisão Bibliográfica	9
2.1. Actinobactérias.....	9
2.2. Enzimas hidrolíticas.....	10
2.3. Solo e serrapilheira.....	11
3 OBJETIVOS	13
3.1. GERAL	13
3.2. ESPECÍFICO	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Origem das cepas	13
4.2 Atividades Amilolítica	13
4.3 Atividade celulolítica	14
4.4 Determinação do Índice enzimático	15
4.5 Análises estatísticas.....	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1 Atividade Amilolítica	16
5.2 Atividade celulolítica	19
6 CONCLUSÃO	24
PERSPECTIVAS FUTURAS	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 Introdução

As actinobactérias possuem uma ampla distribuição, estão presentes em ambientes terrestres e aquáticos, incluindo marinhos (BARKA *et al.*, 2016). Podendo ocorrer também como simbioses de invertebrados marinhos (BULL; STACH, 2007). Para McCarthy *et al.* (1992), a ubiquidade desses micro-organismos pode ser explicada pelo fato de terem alta diversidade metabólica, podendo utilizar diversas fontes de carbono, e possuírem uma grande capacidade de produzir esporos.

As actinobactérias são micro-organismos que produzem uma notável variedade de produtos secundários ao seu metabolismo (BULL; STACH, 2007). Tais produtos tem grande importância biotecnológica e industrial, tais como enzimas e antibióticos (LAM *et al.*, 2006). Além disso, também possuem grande importância ecológica devido às interações que realizam com outros micro-organismos e plantas presentes no solo (SILVA, 2016).

Dentre as enzimas produzidas pelas actinobactérias, a α -amilase é muito importante na indústria e sua estrutura é completamente conhecida, sua função é a degradação do amido (SARIKAYA *et al.*, 2000). Esse polissacarídeo, formado por amilose e amilopectina, é a principal reserva nutritiva das plantas (SIQUEIRA *et al.*, 1994). A celulose, uma das principais fontes de carbono presentes no solo e o principal componente de construção das células vegetais é degradada pela enzima celulase em seus monossacarídeos, glicose (SILVA *et al.*, 2015; SHAIKH *et al.*, 2013).

A região semiárida possui um clima com temperaturas altas, acima dos 20° C de médias anuais, precipitações escassas, entre 280 a 800 mm e déficit hídrico (ARAÚJO, 2011). Em relação aos solos, de maneira geral, são rasos ou pouco profundos e em algumas áreas contem uma camada superficial, denominada serrapilheira, cuja função principal é proteção do mesmo contra altas temperaturas, e que apresenta uma micro e macro fauna que atua diretamente na fertilização do solo (AZEVEDO COSTA *et al.*, 2007).

A ciclagem dos compostos presentes no solo é fundamental para manutenção dos ciclos biogeoquímicos e para a disponibilidade de nutrientes, em especial em ambiente semiárido, onde os solos são pobres em matéria orgânica e nitrogênio (LEMOS *et al.*, 2010).

Diante da importância das actinobactérias para o ambiente semiárido, ciclagem de nutrientes, degradação de polissacarídeos complexos e interação com outros seres vivos são importante aumentar o conhecimento a respeito desses micro-organismos e sua influência nesse ambiente (SILVA, 2016; LEMOS *et al.*, 2010).

Nesse estudo faremos a avaliação da produção de enzimas hidrolíticas ,determinação do potencial enzimático e comparação do índice enzimático entre cepas de actinobactérias oriundas do solo e da serrapilheira da Estação Ecológica de Aiuaba (Ce).

2 Revisão Bibliográfica

2.1. Actinobactérias

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas com DNA rico em citosina e guanina, é um grupo que abrange vários gêneros, dentre eles *Salinispora*, *Frankia*, *Nocardia*, *Micromonospora* e *Streptomyces* (BARKA *et al.*, 2016). Podem ser aeróbias, anaeróbios, heterótrofas, quimiotróficas, e, principalmente, saprófitas (LEWIN *et al.*,2016; GOODFELLOW; WILLIAMS ,1983). Podem ser isoladas de vários lugares, como tecidos de plantas, solo, invertebrados marinhos e solo marinho (SHARMA, 2014; SIVAKUMAR *et al.*, 2007).

Uma das características mais marcantes de muitos gêneros das actinobactérias é a formação de micélio aéreo, oriundo do crescimento com formação de hifas ramificadas, e a semelhança de seus esporos com esporos de fungos (BARKA *et al.*, 2016; BRITO *et al.*, 2015; MCCARTHY *et al.*,1992). Devido a essas particularidades, as actinobactérias foram consideradas uma transição entre bactéria e fungo (BARKA *et al.*, 2016).

No início do século XX, as actinobactérias tiveram destaque na produção de antibiótico, pois produzem antibióticos com uma estrutura química diversa (VINING, 1990). Esses produtos são importantes no biocontrole de doenças em plantas e humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2014; SHARMA, 2014).

Esses micro-organismos são conhecidos por produzirem diversos componentes, como pigmentos e enzimas (SILVA, 2016; SILVA *et al.*, 2015). Os principais pigmentos produzidos pelas actinobactérias são os carotenoides, que ganharam visibilidade devido à aplicabilidade na saúde humana, além de suas

aplicações em indústrias, e os melanóides, que podem atuar protegendo o micro-organismo contra estresses ambientais (SILVA, 2016; RAMOS *et al.*, 2015).

As actinobactérias também podem produzir diversos componentes utilizados na indústria agrícola, como pesticidas e herbicidas, que tem como vantagem redução da poluição do ambiente, principalmente as águas subterrâneas, por serem biodegradáveis (TANAKA; OMURA, 1993). Também são importantes em processos de biorremediação, que é a degradação de materiais tóxicos para o ambiente (SHARMA, 2014), como alguns pesticidas (ZANELLA, 2014).

Essas bactérias tem importante papel ecológico, visto que são responsáveis pela reciclagem de nutrientes do solo (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). A decomposição feita por bactérias faz a quebra de compostos complexos contendo carbono e nitrogênio, tal ação é muito importante para os ciclos de elementos químicos e é isso que cria uma base para a produção vegetal e manutenção das colônias microbianas no solo (BURNS *et al.*, 2013).

2.2. Enzimas hidrolíticas

A importância das enzimas vem de sua ampla aplicação na indústria alimentícia, produção de vinhos, pães e queijos, indústria de papel e nas reações químicas que catalisam nos diversos seres vivos (BEG *et al.*, 2001). Além disso, a atividade enzimática possui um papel importante no processo de decomposição de substratos e ciclagem de nutrientes (CARNEIRO *et al.*, 2008), o que reflete diretamente o potencial do solo (GIANFREDA *et al.*, 2012). Segundo Burns (1982), existem várias categorias de enzimas presentes no solo, dentre elas, a que é considerada verdadeiramente extracelular, produzida por bactérias Gram-positivas e que possuem baixo peso molecular, sendo secretadas em estado aquoso.

As actinobactérias podem secretar uma grande variedade de enzimas, como catalase, lipase, caseinase, gelatinase, celulase, amilase, quitinase e uréase (RAMESH; MATHIVANAN, 2009; MINOTTO *et al.*, 2014; SHARMA, 2014). Isso permite que esses micro-organismos utilizem diversas fontes de carbono (MCCARTHY *et al.*, 1992). Assim, a produção de enzimas extracelulares é uma vantagem evolutiva desses micro-organismos, pois conseguem utilizar maior número de substratos (CAVALCANTE *et al.*, 2016).

O complexo enzimático quitinase faz degradação da quitina, polímero presente na parede celular de fungos e no exoesqueleto de insetos e crustáceos, podendo ter importante aplicação no biocontrole contra fungos patógenos (GOMES *et al.*, 2000; GONZALEZ-FRANCO *et al.*, 2003).

A produção de catalase por actinobactérias pode agir como controle biológico de doenças em plantas e é usado na indústria de laticínios e cerveja (MINOTTO *et al.*, 2014; SHARMA, 2014). Enzimas capazes de decompor moléculas de triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol são chamadas lipases (CAVALCANTE *et al.*, 2015) e possuem grande utilidade na indústria (CARDENAS *et al.*, 2001).

Por ser facilmente encontrada no solo, a celulose é a maior fonte de carbono renovável (SILVA *et al.*, 2015 ; PERSSON; TJERNELD; HAHN-HÄGERDAL, 1991). Representa cerca de 1/3 do CO₂ fixado pelas plantas (SIQUEIRA *et al.*, 1994) e sua degradação é feita por um conjunto de enzimas denominado Complexo Celulase, que, na maioria dos estudos, se refere à um conjunto de enzimas microbianas capazes de degradar a celulose em monômeros de glicose, gerando açúcares e combustíveis (PEIXOTO *et al.*, 2006; SHARADA *et al.*, 2014).

O amido é o principal polissacarídeo de reserva dos vegetais, sendo assim, uma importante e fácil fonte de energia (PEIXOTO *et al.*, 2006). A produção de amilase representa 25-33% da produção de enzimas no mundo (NGUYEN *et al.*, 2002). A amilase bacteriana é bastante usada na fabricação de papéis, adesivos, indústria têxtil e na panificação e liquefazem o amido mais eficientemente do que as amilases fúngicas (PEIXOTO *et al.*, 2006).

2.3. Solo e serrapilheira

O solo pode ser definido como um ambiente heterogêneo, complexo e com limite de nutriente composto por uma matriz porosa de gases e líquidos contendo a uma grande diversidade de micro-organismos (TYC *et al.*, 2016). A harmonia dessas diferentes partes, partículas minerais, organismos vivos, água e gases, tem grande importância para os diversos processos que nele acontecem e influenciam sua produtividade (CUNHA *et al.*, 2010). O solo do semiárido nordestino caracteriza-se pela fina camada de serrapilheira e predominância de rochas cristalinas, tais rochas dificultam o acúmulo de água subterrânea devido sua baixa porosidade (ZANELLA,

2014). Possuem grande heterogeneidade em função de vários fatores que o influenciam: relevo, material de origem, umidade, cobertura vegetal, dentre outros (CUNHA *et al.*, 2010).

De acordo com Santana; Souto (2011), a serrapilheira é constituída por galhos, cascas, material de origem animal, fezes e corpos, e, principalmente, material foliar. A maior predominância de material foliar pode ser devido a adaptação contra a perda de água durante o tempo de seca (SANTANA; SOUTO,2011). Para Siqueira *et al.* (1994), um solo sem serrapilheira não possui nutrientes necessários para micro - organismos heterótrofos. Corroborando com Carvalho *et al.* (2008), que afirmaram que solos com serrapilheira são mais férteis do que solos sem serrapilheira.

Os resultados da atividade biológica e os progressos pedogenéticos podem ultrapassar a altura de 200 cm (SANTOS *et al.*, 2006). Nesse habitat, os micro-organismos se encontram na parte porosa e sua presença e quantidade depende da adaptabilidade de cada espécie (SIQUEIRA *et al.*,1994).

Assim, para uma melhor utilização do solo, é necessário gerenciar seus recursos, como recurso hídrico e potencial genético, e maximizar o potencial clima e isso só é possível obtendo conhecimento dos recursos do solo (CUNHA *et al.*, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1. GERAL

-Avaliar a produção de enzimas hidrolíticas por actinobactérias oriundas do solo e da serrapilheira da Estação Ecológica de Aiuaba (Ce).

-Determinar o potencial enzimático das actinobactérias coletadas na Estação Ecológica de Aiuaba.

3.2. ESPECÍFICO

-Comparar o índice enzimático entre cepas de actinobactérias solo e serrapilheira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem das cepas

As 58 cepas utilizadas foram previamente isoladas e caracterizadas do solo e serrapilheira da Unidade de Conservação Estação Ecológica de Aiuaba (Esec de Aiuaba) por Lima *et al.* (2014). Essas cepas fazem parte da coleção do Laboratório de microbiologia ambiental (LAMAB) da Universidade Federal do Ceará, Departamento de biologia.

A Estação ecológica de Aiuaba (Esec de Aiuaba) está localizada no município de Aiuaba, Estado do Ceará, com área de 11.746,60 hectares com coordenadas 6° 40' S & 40° 10' W, onde predomina o bioma de Caatinga (ICMBIO) e o clima semiárido (LIMA *et al.*, 2017).

Dessas 58 actinobactérias, 19 foram provenientes do solo (Ac 8, Ac 9, Ac 21, Ac 23, Ac 24, Ac 31, Ac 32, Ac 36, Ac 46, Ac 49, Ac 50, Ac 54, Ac 55, Ac 56, Ac 57, Ac 58, Ac 59, Ac 60, Ac 61) e 39 foram provenientes da serrapilheira (Ac 1, Ac 2, Ac 3, Ac 4, Ac 5, Ac 6, Ac 7, Ac 10, Ac 11, Ac 12, Ac 13, Ac 14, Ac 15, Ac 16, Ac 17, Ac 18, Ac 20, Ac 22, Ac 25, Ac 26, Ac 27, Ac 28, Ac 29, Ac 30, Ac 33, Ac 34, Ac 35, Ac 37, Ac 38, Ac 40, Ac 41, Ac 42, Ac 43, Ac 44, Ac 45, Ac 47, Ac 48, Ac 51, Ac 53).

4.2 Atividades Amilolítica

O meio utilizado para o teste amilolítico foi Ágar-amido que apresenta a seguinte composição para 1000 mL de água destilada: peptona (10g), extrato de

carne (3g), NaCl (5g), amido (2g) e ágar (15g) com pH 6,5-7,1 (ALARIYA, *et al.*,2013).

As actinobactérias foram inoculadas no meio em *spot* quadruplicada realizando-se dois ensaios e depois colocadas na B.O.D. numa temperatura de 28°C durante 10 dias. A revelação do teste amilolítico foi feita utilizando-se 10 mL de solução de lugol e (Iodo (1g), iodeto de potássio (2g) e 300 mL de água destilada) deixando agir durante um minuto. O lugol cora o meio com uma tonalidade de azul escuro. A presença de um halo claro ao redor da colônia indica atividade positiva para a produção de amilase (Figura 1).

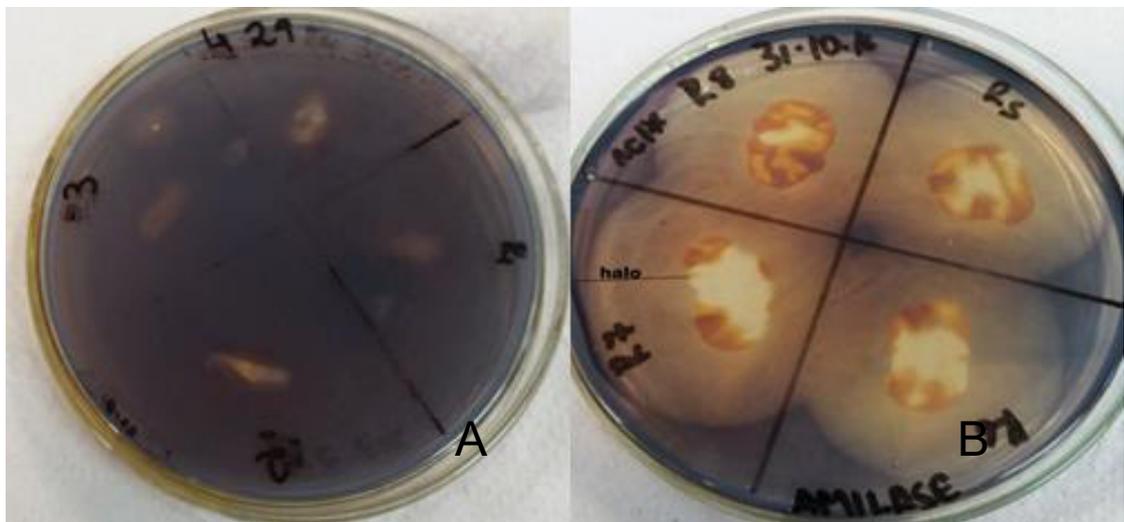


Figura 1:A-Ausência de halo de degradação; B- Presença de halo de degradação na placa contendo amido.

4.3 Atividade celulolítica

O meio utilizado para o teste celulolítico foi Ágar-celulose que apresenta a seguinte composição para 1000 mL de água destilada: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g) , KCl (0,5g), $NaNO_3$ (3 g), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01g), K_2HPO_4 (1 g), carboximetilcelulose (5 g), ágar (15 g) com pH=6,0 (COURI; FARIAS,1995) . A revelação do teste celulolítico foi feita com 10 mL de solução de vermelho-congo (0,25 g de vermelho-congo para 100mL de água destilada) em cada placa por 15 minutos, depois lavados com 10 mL de NaCl (2M) e deixados em repouso por 30 minutos. O meio contendo celulose cora de vermelho e a presença do halo alaranjado ao redor da colônia significa que o teste é positivo para produção de celulase (Figura 2).

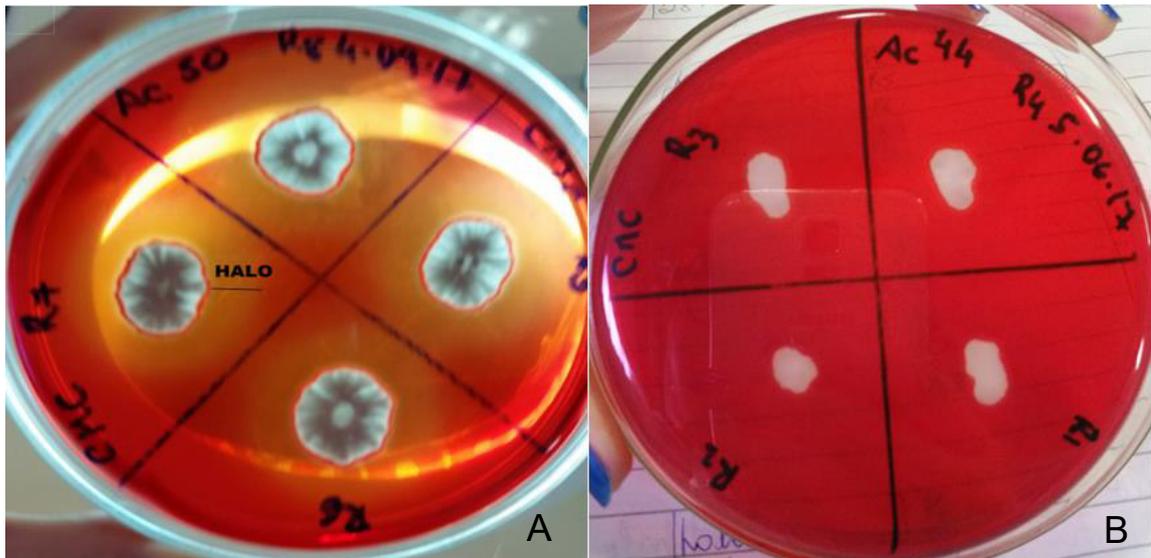


Figura 2: A-Presença de halo de degradação na placa contendo carboximetilcelulose; B - Ausência de halo de degradação.

4.4 Determinação do Índice enzimático

O índice enzimático (IE) foi obtido a partir dividindo-se o diâmetro do halo de hidrólise (D_h) e o diâmetro da colônia (D_c): $IE = \frac{D_h}{D_c}$ (FLORENCIO, 2012). O diâmetro do halo de degradação (D_h) e o diâmetro do halo da colônia (D_c) foram medidos com um paquímetro eletrônico. Cepas que apresentaram IE maior que 2 foram consideradas potencialmente produtoras da enzima (SILVA *et al.*, 2015).

4.5 Análises estatísticas

O programa utilizado para as análises estatísticas foi o Past (2003). Foram feitos testes de normalidade, Shapiro-Wilk, com as médias dos índices enzimáticos amilolítico e celulolítico. Realizou-se uma ANOVA (análise de variância) para comparar as médias dos índices enzimáticos das cepas oriundas do solo e serrapilheira.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade Amilolítica

Em relação às cepas oriundas do solo, 9 cepas (47,36%) apresentaram $IE > 2$ e 14 cepas (35,89%) das actinobactérias da serrapilheira tiveram $IE > 2$. Duas cepas destacaram-se com o índice enzimático superior a três, a Ac 36 proveniente do solo e Ac 38 da serrapilheira (Figura 3).

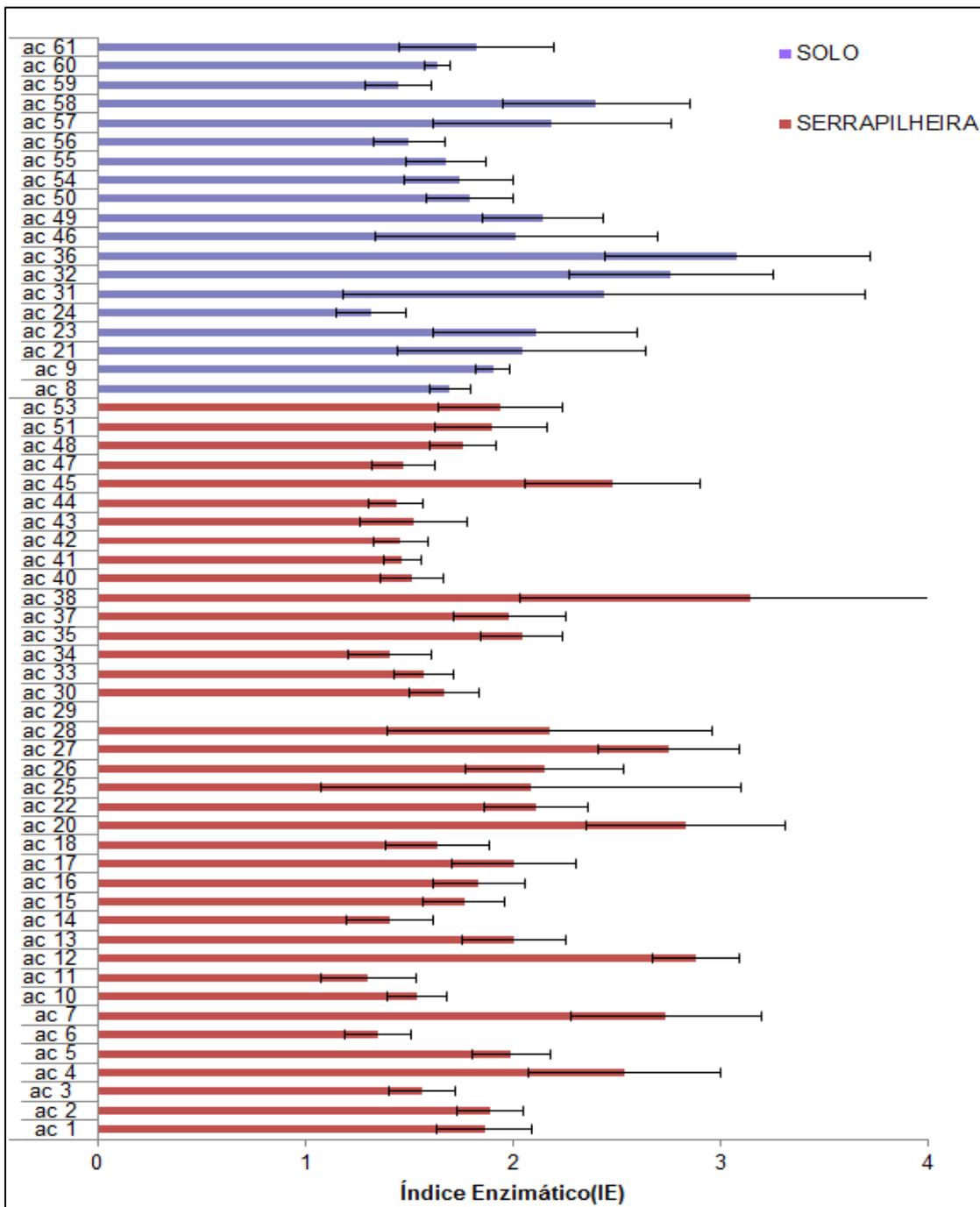


Figura 3: Perfil enzimático amilolítico das actinobactérias.

Dentre as 58 actinobactérias utilizadas, 57 apresentaram halo de degradação, sendo a cepa Ac 29, oriunda da serrapilheira, a única que não hidrolisou o amido (Figura 4).

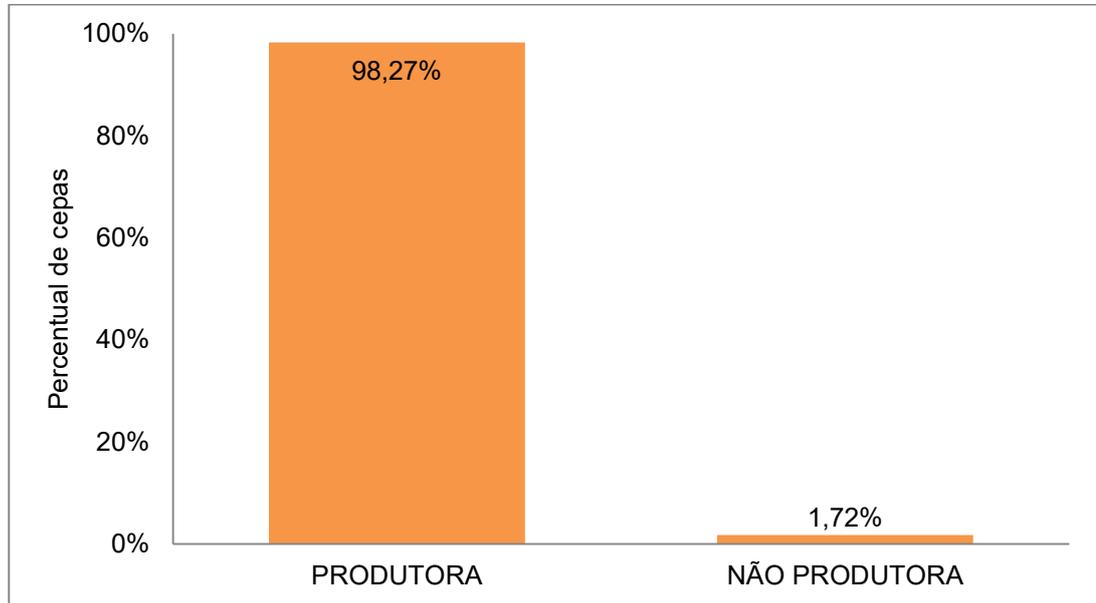


Figura 4: Porcentagem de actinobactérias produtoras e não produtoras de amilase.

Esse alto percentual de actinobactérias produtoras de enzima amilolítica também foi relatada por Silva (2016), que analisou 27 cepas de actinobactéria coletadas no Parque Nacional de Ubajara, e apenas 4 (14,81%) não apresentaram essa atividade enzimática.

Esse fato pode estar relacionado com a abundância do amido no solo, pois ele é o principal composto de reserva das plantas e é uma importante fonte de energia para vários outros organismos (AMARAL *et al.*, 2007).

Segundo Silva et al. (2015), as actinobactérias podem ser classificadas em relação a produção de enzima como cepas fortemente produtoras ($IE \geq 2$), cepas moderadamente produtoras ($1,5 \leq IE < 2$), cepas fracamente produtoras ($1 < IE < 1,5$) e não produtoras (ausência de halo de hidrólise).

Assim, das 58 cepas de actinobactérias, 23 cepas foram classificadas como fortemente produtoras (39,65%), 14 oriundas da serrapilheira (Ac 4, Ac 7, Ac 12, Ac 13, Ac 17, Ac 20, Ac 21, Ac 22, Ac 25, Ac 26, Ac 27, Ac 28, Ac 35, Ac 38, Ac 45) e 9 oriundas do solo (Ac 23, Ac 31, Ac 32, Ac 36, Ac 46, Ac 49, Ac 57, Ac 58), 24 actinobactérias foram classificadas como moderadamente produtoras (43,10%), das quais 18 provenientes da serrapilheira (Ac 1, Ac 2, Ac 3, Ac 10, Ac 15, Ac 16, Ac 18, Ac 30, Ac 33, Ac 37, Ac 40, Ac 43, Ac 47, Ac 48, Ac 53) e 7 do solo (Ac 8, Ac 9, Ac 50, Ac 54, Ac 55, Ac 56, Ac 60, Ac 61), 9 actinobactérias são fracamente produtoras, sendo 7 da serrapilheira (Ac 6, Ac 11, Ac 14, Ac 34, Ac 41, Ac 42) e 2 do solo (Ac 24 e Ac 59), e apenas a cepa Ac 29 foi não produtora, como mostra a figura 5.

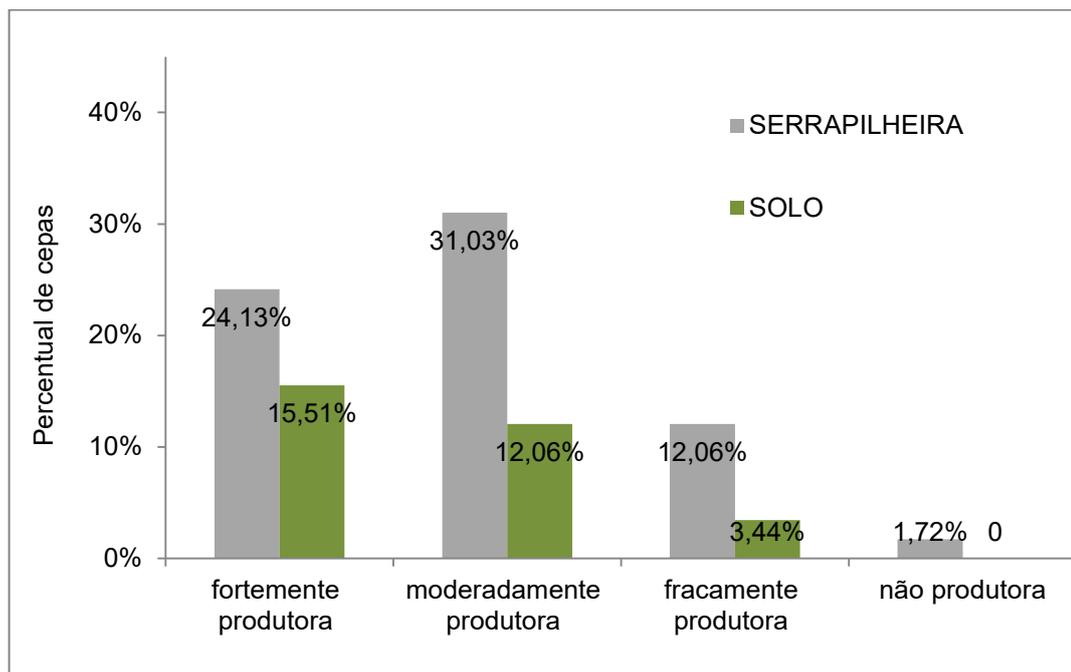


Figura 5: Classificação das cepas de actinobactérias quanto à produção de amilase.

5.2 Atividade celulolítica

Considerando as cepas provenientes do solo 11 cepas, 57,9% tiveram $IE > 2$ e 23 cepas, 58,7% das cepas da serrapilheira tiveram $IE > 2$. Os micro-organismos que se destacaram com $IE > 3$ foram Ac 9 e Ac 32 do solo e as Ac 1, Ac 2, Ac 4, Ac 11, Ac 13, Ac 20 e Ac 26 (Figura 6).

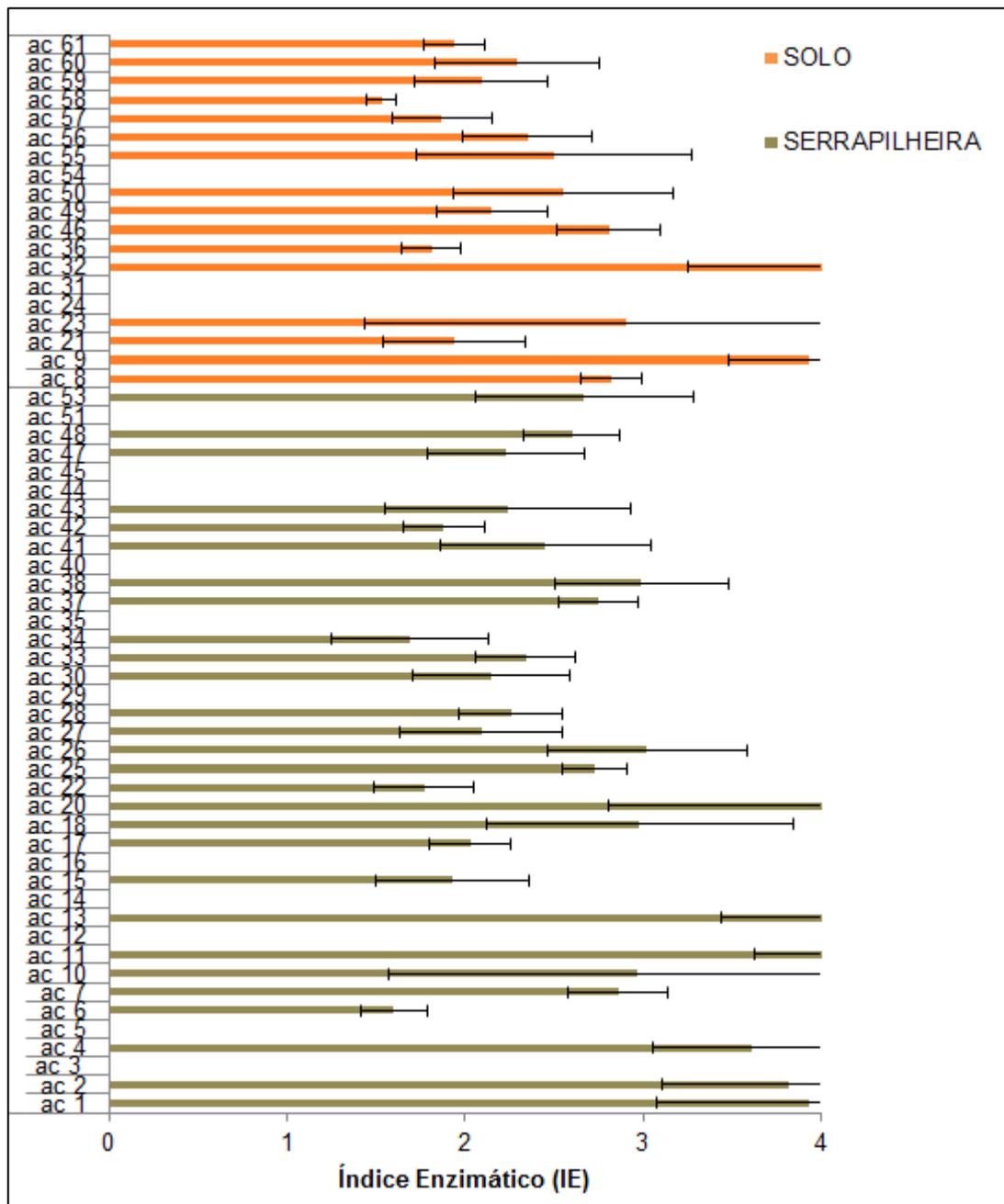


Figura 6: Perfil enzimático celulolítico das actinobactérias.

Das 58 actinobactérias testadas, 44 cepas (75,86%) apresentaram halo de degradação da carboximetilcelulose (Figura 7).

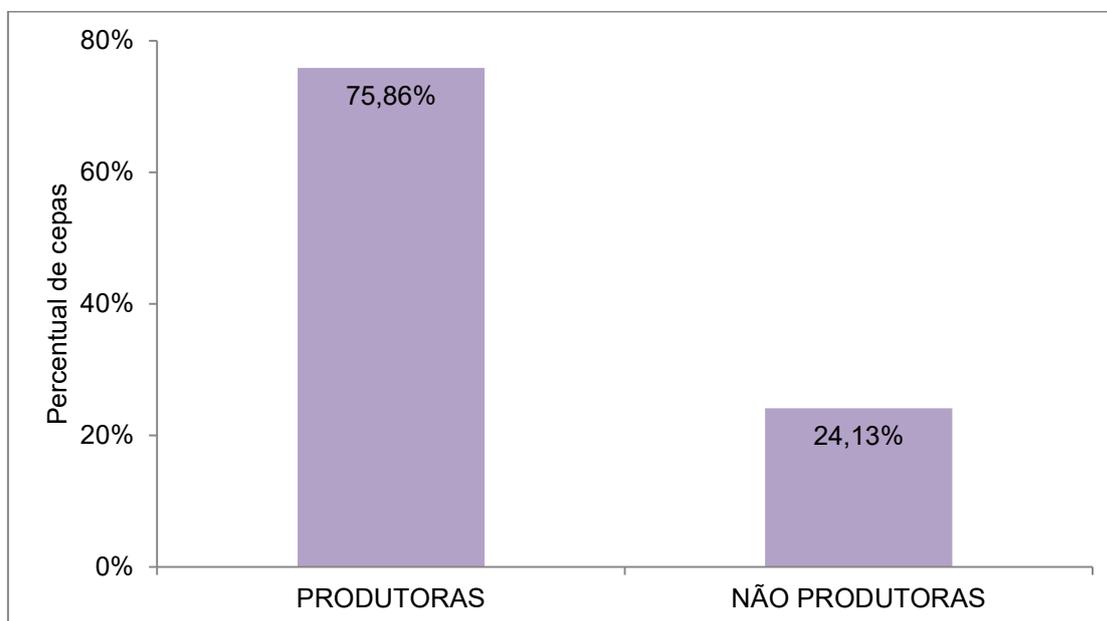


Figura 7: Porcentagem de actinobactérias produtoras de celulase.

Assim, das 58 cepas utilizadas, 34 cepas são fortemente produtoras ($IE \geq 2$) (58,62%), sendo 23 da serrapilheira (Ac 1, Ac 2, Ac 4, Ac 7, Ac 10, Ac 11, Ac 13, Ac 17, Ac 18, Ac 20, Ac 23, Ac 25, Ac 26, Ac 27, Ac 28, Ac 30, Ac 33, Ac 37, Ac 38, Ac 41, Ac 43, Ac 47, Ac 48, Ac 50, Ac 53) e 11 do solo (Ac 8, Ac 9, Ac 32, Ac 46, Ac 49, Ac 55, Ac 56, Ac 59, Ac 60), 10 actinobactérias são moderadamente produtoras ($1,5 \leq IE < 2$) (17,24%), das quais 5 são da serrapilheira (Ac 6, Ac 15, Ac 22, Ac 34, Ac 42) e 5 são oriunda do solo (Ac 21, Ac 36, Ac 57, Ac 58, Ac 61), nenhuma cepas se encaixou na classificação fracamente produtora ($1 < IE < 1,5$) e 14 cepas são não produtoras (24,13%), 11 oriundas da serrapilheira (Ac 3, Ac 5, Ac 12, Ac 14, Ac 16, Ac 29, Ac 35, Ac 40, Ac 44, Ac 45, Ac 51) e 3 do solo (Ac 24, Ac 31, Ac 54), como ilustrados na figura 8.

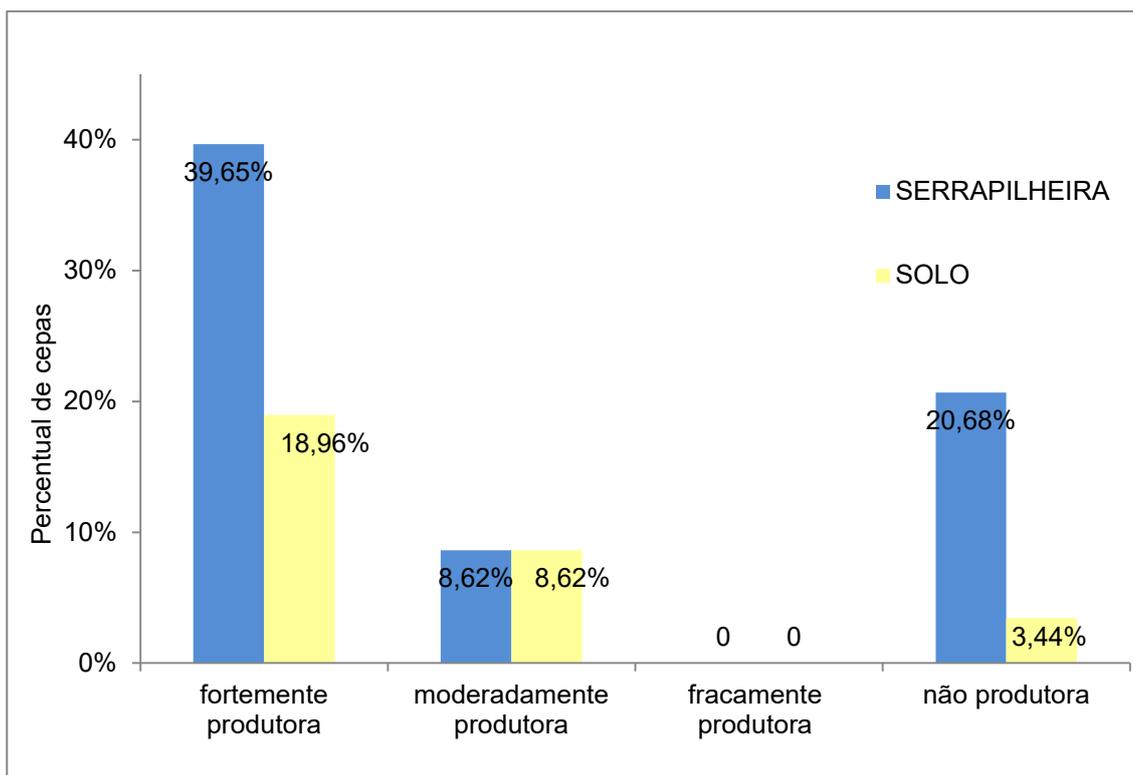


Figura 8: Classificação das cepas de actinobactérias quanto à produção de celulase.

Tiveram forte produção de ambas as enzimas 14 cepas (serrapilheira: Ac 4, Ac 7, Ac 13, Ac 17, Ac 20, Ac 25, Ac 26, Ac 27, Ac 28; Ac 38, Ac 46, Ac 49; solo: Ac 23, Ac 32). Tiveram moderada produção das enzimas, amilase e celulase, 2 cepas (serrapilheira: Ac 15; solo: Ac 61). E a cepa Ac 29, oriunda da serrapilheira não apresentou halo de degradação para nenhuma enzima.

A prevalência de cepas produtoras de ambas as enzimas na serrapilheira pode ser atribuído à predominância de biopolímeros em sua composição, necessitando assim de uma forte atividade enzimática para a completa degradação desses compostos mais complexos (ŠTURSOVÁ *et al.*, 2012; BOER, 2005; URBANOVÁ ;ŠNAJDR; BALDRIAN, 2015). Além disso, Šnajdr, 2013 afirma que a composição da comunidade microbiana deve ser um melhor prognóstico para a atividade enzimática na serrapilheira do que no solo.

A maior presença de cepas produtoras no solo (Figura 9) pode indicar uma maior quantidade de actinobactérias nesse habitat pois a presença de serrapilheira tem influência positiva na disponibilidade de nutrientes no solo. Ao avaliarem a atividade microbiana em solos com e sem serrapilheira, determinado indiretamente

pela evolução de CO₂, Carvalho *et al.* (2008) observaram uma maior atividade biológica em solos com serrapilheira.

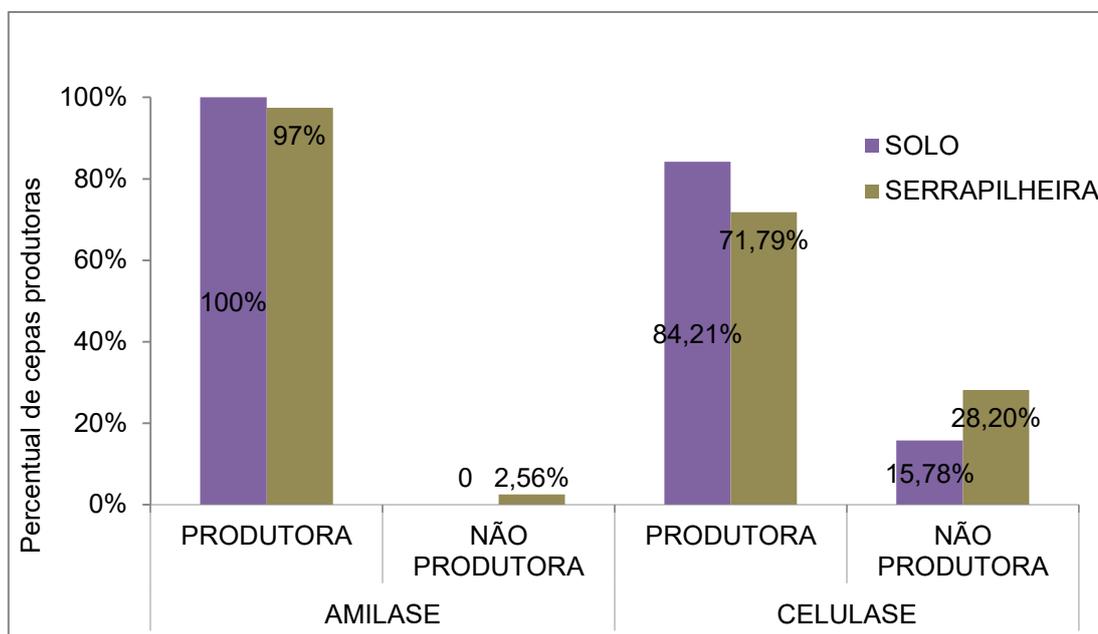


Figura 9: Porcentagem de actinobactérias produtoras de celulase no solo e na serrapilheira.

Resultado semelhante foi encontrado por Silva (2016), com 85% das actinobactérias coletadas do Parque Nacional de Ubajara (PNU) apresentaram atividade amilolítica positiva e apenas 66% das cepas tiveram atividade celulolítica positiva. Minotto (2014) também observou que 100% das cepas provenientes de solo de raiz de tomate apresentaram produção de amilase e 26,08% apresentaram produção de celulase. A maior produção amilolítica do que celulolítica como observado na figura 10 pode estar relacionada com a estrutura do amido e da celulose, por ter uma estrutura mais simples, o amido pode ser mais acessível para os micro-organismos (SILVA, 2016). Esse alto percentual de cepas produtoras de enzimas é muito importante para a renovação de nutrientes no solo do semiárido, pois é apenas assim que os polissacarídeos orgânicos complexos são degradados e, posteriormente, absorvidos (CADWELL, 2005).

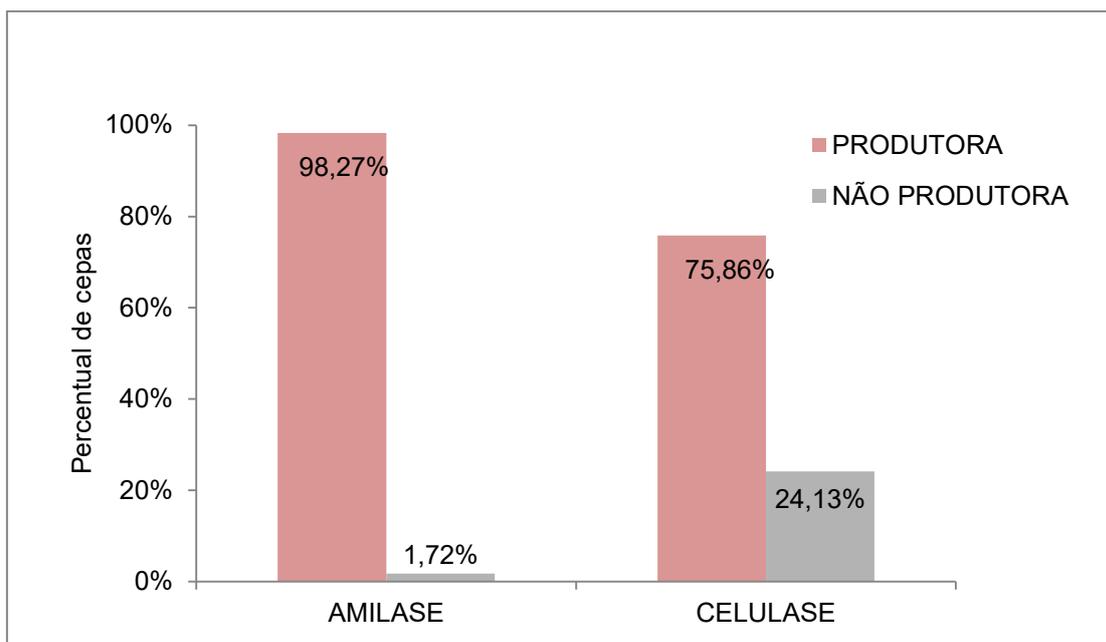


Figura 10: Porcentagem de cepas produtoras de enzimas extracelulares.

O teste de normalidade realizado, Shapiro-Wilk, demonstrou que os dados acompanharam a linha de tendência e o p (índice de significância) foi maior que 0 ($p > 0$), assim, a distribuição dos dados é Normal. Além disso, essas amostras seguem o teorema de limite central que afirma que quanto maior é a amostra, maior é a chance de suas variáveis serem distribuídas normalmente (ABBAD; TORRES, 2002).

Ao comparar a produção das enzimas das cepas de solo e serrapilheira, realizando uma ANOVA (análise de variância), não houve diferenças estatísticas ($p = 0,51$, índice de significância da atividade amilolítica e $p = 0,1$, índice de significância para atividade celulolítica) entre a produção enzimática do solo e da serrapilheira.

Urbanová; Šnajdr; Baldrian (2015) encontraram em comunidades bacterianas do solo da República Tcheca, essas comunidades apresentaram maior diversidade e uniformidade na serrapilheira do que no solo. Infere-se que devido ao alto índice enzimático apresentado pelas cepas do solo, esta apresentou uma mesma produção enzimática da serrapilheira.

Além disso, devido a sua composição, a serrapilheira tem maior influência na comunidade de fungos do que na comunidade de bactérias, pois estas degradam compostos com menor massa molecular, proveniente da degradação prévia dos fungos (ŠTURSOVÁ *et al.*, 2012; BOER, 2005; URBANOVÁ; ŠNAJDR; BALDRIAN, 2015).

6 CONCLUSÃO

As cepas da Estação Ecológica de Aiuaba tem potencial para a produção de enzimas extracelulares, devido aos seus altos índices enzimáticos. Houve maior produção da enzima amilase, 98,27%, do que da enzima celulase, 75,86%. Maior presença de actinobactérias produtoras de enzima no solo que na serrapilheira (amilase, 100% no solo e nas 97% serrapilheira; celulase 84,21% no solo e 74,21% na serrapilheira). A origem da actinobactérias não afetou a atividade enzimática, possivelmente pelo alto índice enzimático encontrado no solo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Nos próximos trabalhos, pode-se testar a produção enzimática com outras enzimas para analisar melhor o perfil enzimático dessas actinobactérias de Aiuaba.

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.
- ARAÚJO, S. M. S. de. A Região Semiárida do Nordeste do Brasil: questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. **Rios Eletrônica-Revista Científica da FASETE**. Ano, v. 5, 2011.
- ABBAD, G. da S.; TORRES, C. V. Regressão múltipla stepwise e hierárquica em Psicologia Organizacional: aplicações, problemas e soluções. 2002.
- AMARAL, L. do *et al.* Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.
- AZEVEDO COSTA, C. C. *et al.* Produção de serrapilheira na Caatinga da Floresta Nacional do Açu-RN. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 246-248, 2007.
- 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.
- BEG, Q. *et al.* Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.
- BOER, W. de *et al.* Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 795-811, 2005.
- BRITO, F. A. E. *et al.* Actinobactérias do solo rizosférico no bioma caatinga. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.21, p.1992-2004, 2015.
- BULL, Al. T.; STACH, J. E. M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. **Trends in microbiology**, v. 15, n. 11, p. 491-499, 2007.
- BURNS, R. G. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 14, n. 5, p. 423-427, 1982.
- BURNS, R. G. *et al.* Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 58, p. 216-234, 2013.
- CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 637-644, 2005.
- CARNEIRO, M. A. C. *et al.* Atributos bioquímicos em dois solos de cerrado sob diferentes sistemas de manejo e uso. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.38, n.4, p. 276-283, 2008.
- CARVALHO, A. M. X. Atividade microbiana de solo e serrapilheira em áreas povoadas com *Pinus elliottii* e *Terminalia ivorensis*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32,p. 2709-2716, 2008.

CAVALCANTE, F.G. *et al.* Atividade lipolítica de cepas de actinobactérias isoladas de solos do semiárido. **In: I Conidis**, Campina Grande, 2016.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v. 26, n. 4, 1995.

CUNHA, T. J. F. *et al.* Principais solos do semiárido tropical brasileiro: caracterização, potencialidades, limitações, fertilidade e manejo. **Embrapa Semiárido**-Capítulo em livro científico (ALICE), 2010

FLORENCIO, C. *et al.* Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. **Enzyme research**, v. 2012, 2012.

GIANFREDA, L. *et al.* Enzymes in soil: properties, behavior and potential applications. **Developments in Soil Science**, v. 28, p. 301-327, 2002.

GOMES, R. C. *et al.* Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 146-150, 2000.

GONZALEZ-FRANCO, A. C. *et al.* Actinobacterial chitinase-like enzymes: profiles of rhizosphere versus non-rhizosphere isolates. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 683-698, 2003.

GOODFELLOW, Michael; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 189-216, 1983.

LAM, K. S. *et al.* Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, 9: 245-251. 2006.

LEMOES, J. R.; MEGURA, M. Florística e fitogeografia da vegetação decidual da Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira Biociências**, v. 8, p. 34-43, 2010.

LEWIN, G. R. *et al.* Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual review of microbiology**, v. 70, p. 235-254, 2016.

LIMA, J. V. L. *et al.* Characterization of actinobacteria from the semiarid region, and their antagonistic effect on strains of rhizobia. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 11, p.499, 2017.

LIMA, J. V. L. *et al.* Populações microbianas cultiváveis do solo e serrapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 2300-2316, 2014.

MCCARTHY, Alan J.; WILLIAMS, Stanley T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review. **Gene**, v. 115, n. 1, p. 189-192, 1992.

MINOTTO, E. *et al.* Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, n. 2, 2014.

NGUYEN, Q. D. *et al.* Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 31, n. 3, p. 345-352, 2002.

OLIVEIRA, A. P. G. *et al.* Importância das actinobactérias em processos ecológicos, industriais e econômicos. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n.18; p. 3938-3952, 2014.

PEIXOTO, A.B. *et al.* Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil,2006. Disponível em <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/256543>>. Acesso em 25 de Outubro de 2017.

PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzyme production: a review. **Process Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 65-74, 1991.

RAMESH, Subramani; MATHIVANAN, Narayanasamy. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2103-2111, 2009.

RAMOS, K. A. *et al.* Caracterização e diversidade cromogênica de actinobactérias de um nicho microbiano preservado no bioma caatinga. **Enciclopédia Biosfera**, v.11,n.21,p.2115-2125,2015.

SANTANA, J. A. da S.; SOUTO, J. S. Produção de serrapilheira na Caatinga da região semiárida do Rio Grande do Norte, Brasil. **Idesia, (Arica)**, v. 29, n. 2, p. 87-94, 2011. Disponível em <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071834292011000200011&lng=es&nrm=iso>. Acessado em 13 de setembro de 2017.

SARIKAYA, E. *et al.* Comparison of degradation abilities of α -and β -amylase on raw starch granules. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 8-9, p. 711-715, 2000.

SHAIKH, N. M. *et al.* Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. **Universal Journal of Environmental Research & Technology**, v. 3, n. 1, p.39-49,2013.

SHARADA, R. *et al.* Applications of cellulases-review. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences**, v. 4, n. 2, 2014.

SHARMA, Mukesh. Actinomycetes: source, identification, and their applications. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 3, n. 2, p. 801-832, 2014.

SILVA, V. M., MARTINS, C. M., MARTINS, S. C. S. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, 11,p. 2026-2036 ,2015.

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.

SIQUEIRA, J. O. *et al.* Micro-organismos e processos biológicos do solo. **Perspectiva ambiental**. Brasília: Embrapa. 142 p. 1994.

SIVAKUMAR, K. *et al.* Research on marine actinobacteria in India. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 186-196, 2007.

ŠNAJDR, J. *et al.* Dominant trees affect microbial community composition and activity in post-mining afforested soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 56, p. 105-115, 2013.

ŠTURSOVÁ, M. *et al.* Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 735-746, 2012.

TANAKA, Y.; OMURA, S. Agroactive compounds of microbial origin. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 57-87, 1993.

TORRES, I. F. *et al.* The role of lignin and cellulose in the carbon-cycling of degraded soils under semiarid climate and their relation to microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 75, p. 152-160, 2014 .

TYC, O. *et al.* The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. **Trends in microbiology**, v.25,n.4,p. 280-292,2016.

URBANOVÁ, M.; ŠNAJDR, J.; BALDRIAN, P. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 84, p. 53-64, 2015.

VINING, L.C. Functions of secondary metabolites. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 395-427, 1990

ZANELLA, M. E. Considerações sobre o clima e os recursos hídricos do semiárido nordestino. **Caderno Prudentino de Geografia**, n. 36, p. 126-142, 2014.