CBRO
Congresso Brasileiro de Resíduos Orgânicos
08 a 09 de outubro de 2009
Hotel Canto do Sol - Vitória-ES

SELEÇÃO DE ACTINOMICETOS PRODUTORES DE XILANASES, CELULASE E QUITINASE ISOLADO DE RESÍDUOS DE SISAL DA REGIÃO SISALEIRA

Eliane Leal Candeias[1]; Cristiane Duarte dos Santos[1]; Aline Simões da Rocha Bispo[1]; Zozilene Nascimento Santos Teles[1]; Márcia Oliveira do Carmo[1]; Ana Cristina Fermino Soares[1]

[1]Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB), Cruz das Almas, BA, e-mail: agrcandeias@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Os estreptomicetos são bactérias Gram-positivas, aeróbicas estritas, filamentosas, que sofrem mudanças morfológicas em todo seu ciclo de vida. O gênero *Streptomyces* é o mais estudado entre os actinomicetos, devido à elevada produção de antibióticos e enzimas extracelulares (WATVE et al.,2001). A produção desses compostos pelos actinomicetos em sido associada à diferenciação na sua morfologia celular, tal como a produção de esporos, podendo ser limitada ou inibida por deficiências nutricionais. Na rizosfera, dada à quantidade de nutrientes exsudados, a deficiência nutricional não se apresenta como um fator limitante à produção de metabólitos secundários pelos actinomicetos (WILLIAMS & VICKERS, 2000).

Dentre as importantes características dos estreptomicetos, enumera-se a capacidade de degradação de moléculas complexas e recalcitrantes, especialmente a celulose, lignina e xilana, fazendo com que tenham um papel importante nos processos de compostagem (CRAWFORD, 1988; RAMÍREZ et al., 2003), além de produzirem sideróforos, quitinase, β-glucanases e antibióticos que agem no controle de organismos antagônicos (OLIVEIRA et al., 2003; CRAWFORD et al., 1993).

A quitina depois da celulose é o polímero mais abundante da natureza, sendo encontrada como constituinte do exoesqueleto de insetos, de crustáceos e conchas de moluscos, sendo também o maior componente da parede celular de fungos. As quitinases produzidas por muitos organismos, entre eles os estreptomicetos, são enzimas hidrolíticas com a

propriedade de hidrolisar a quitina em oligômeros de N-acetilglicosamina (NAG), que assim podem ser absorvidos e metabolizados (GOODAY, 1990; GOODAY et al., 1992).

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Microbiologia/Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias Biológicas e Ambientais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Para a avaliação do resíduo do sisal, foram coletadas amostras de resíduo seco de sisal em quatro (4) áreas produtoras de sisal na região de Serrinha e Campo Formoso, no Estado da Bahia. O isolamento dos actinomicetos foi realizado pela técnica de diluição seriada e plaqueamento em meio AGS sólido (*Arginine-Glycerol-Mineral Salt Agar*). Para o isolamento, 10g de resíduo fresco ou seco (fermentado e seco no campo) foram transferidas para frascos de Erlenmeyer com 90 mL de solução salina (NaCl a 0,85 %) estéril e agitadas por 30 minutos em agitador orbital e temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas as diluições decimais em série (1:10), em tubos de ensaio contendo 9 mL da solução salina estéril, obtendo-se diluições de 10^{-1} a 10^{-5}.

Foi realizado o plaqueamento de 100 µl das diluições 10^{-1} a 10^{-4} em meio AGS sólido para actinomicetos (Levine, 1954) e espalhamento com alça de Drigalsky. O meio AGS é constituído de: 1g de L-arginina; 12,5mL de glicerol; 1g de K_2HPO_4; 1g de NaCl; 0,5g de $MgSO_4 7H_2O$; 1mL de solução de micronutrientes; 20g de agar em 1 litro de água destilada, com pH ajustado para 7,2. A solução de micronutrientes continha: 1g de $Fe_2(SO_4)_3$ ($6H_2O$); 0,1g de $CuSO_4$ $5H_2O$; 0,1g de $ZnSO_4$ $7H_2O$ e 0,1g de $MnSO_4H_2O$ em 100 mL de água destilada. Para o crescimento de actinomicetos, as placas foram incubadas por 12 a 20 dias a 28±2°C em câmara de crescimento tipo B.O.D.. As colônias individualizadas de actinomicetos foram repicadas para meio AGS e incubadas conforme descrito acima, por um período de 12 dias. Para a preservação dos isolados de actinomicetos, as colônias foram raspadas e transferidas para glicerol-água 20%, estéril, em tubos criogênicos com tampa de rosca e mantidos em freezer vertical a temperatura de – 18±2°C.

Para os testes enzimáticos, as culturas de actinomicetos preservadas em glicerol 20%, foram reativadas em meio de cultura AGS e repicadas na forma de *spot* (redondo) para meio de sais minerais, com celulose, xilana ou quitina, como única fonte de carbono, para os testes de atividade celulolítica, xilanolítica e quitinolítica, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 180 isolados de actinomicetos de diversas amostras de resíduo de sisal, coletadas nas áreas de Pau D'arco (PD), Araci (AR), Belas/ Morrinhos (BM) e Baixa do Feijão/Tiquára (BFT), sendo PD, BM e BFT do município de Campo formoso e AR do município de Aracy, Serrinha (Tabela 1). Os isolados foram purificados, preservados em 20% glicerol no freezer e catalogados de acordo com a origem dos mesmos.

Os actinomicetos selecionados para a atividade celulolitíca, xilanolítica e quitinolítca foram obtidos das áreas de produtores denominadas de Pau D'arco (PD), Araci (AR), Belas/ Morrinhos (BM) e Baixa do Feijão/Tiquára (BFT). Dentre os isolados que apresentaram atividade enzimática positiva, destacaram-se 10 isolados codificados como AR 1, AR 9, AR 20, BM 26, BM 27, BFT 20, BFT 40, BFT 93, PD3 e PD 4 para a atividade xinalolítica, 11 isolados codificados como AR 1, MB 24 ,BM 9, BM 18, BM 19, BM 20, BM 26, BM 27, BM 33, BFT 19 e BFT 104 para atividade celulolítica e 13 isolados codificados como BFT 8, BFT 26, BFT 38, BFT 48, BFT 58, BFT 59, BFT 70, BFT 81, BFT 84, BFT 103, BFT 106, PD 3 e PD 4 para a atividade quitinolítica (Tabela 1).

Tabela 1. Total de isolados de actinomicetos, suas respectivas áreas de origem, número de isolados com atividade positiva para celulase, xilanase e quitinase.

Áreas*	Actinomicetos (n. de isolados)	Atividade celulase (n. isolados)	Atividade xilanase (n. isolados)	Atividades quitinase (n. isolados)
PD	13	2	3	2
AR	20	14	8	0
BM	34	31	7	0
BFT	113	93	14	42
Total	180	140	32	44

*Áreas de Pau D'arco (PD), Araci (AR), Belas/ Morrinhos (BM) e Baixa do Feijão/Tiquára (BFT), sendo PD, BM e BFT do município de Campo Formoso e AR do município de Aracy, Serrinha.

Dentre os 180 isolados de actinomicetos testados para atividade enzimática das áreas PD, AR, BM e BFT obteve-se 77,7% positivo para celulase, 17,7% para xilanase e 24,4% para quitinase (Figura 1).

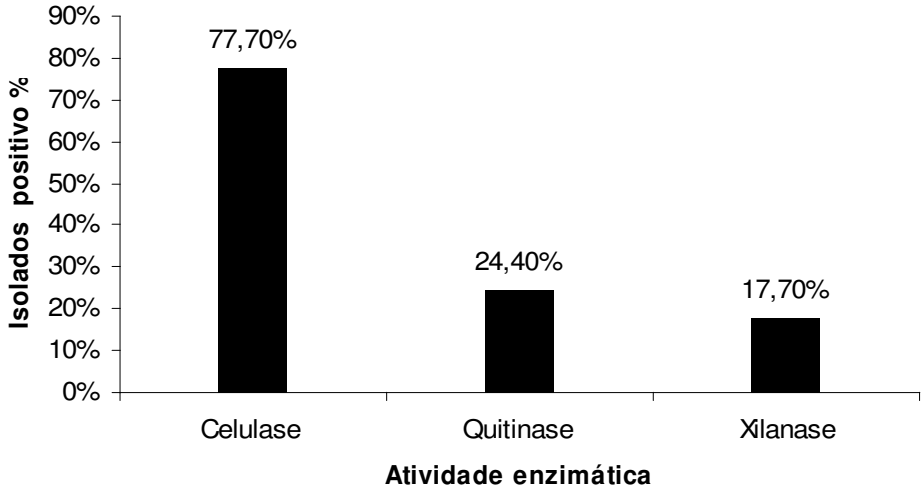


Figura 1. Percentagem dos isolados de actinomicetos que foram positivos para as atividades enzimáticas de celulase, xilanase e quitinase oriundos de resíduo de sisal.

CONCLUSÕES

Foi obtida uma coleção de 180 isolados de actinomicetos do resíduo de sisal, todos caracterizados quanto à atividade pra celulase, xilanase e quitinase.

Foram selecionados isolados de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento e controle biológico.

Estudos futuros deverão avaliar as condições ideais para a o enriquecimento do resíduo de sisal com isolados selecionados de actinomicetos e o efeito desse resíduo enriquecido na promoção de crescimento e controle da podridão vermelha no sisal.

Apoio Financeiro: CNPq e CAPES/PNPD

REFERÊNCIAS

CRAWFORD, D. L. et al. **Isolation and characterization of actinomycete antagonist of fungal root pathogen. Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 59, n. 11, p. 3899-3905, 1993.

CRAWFORD, D. L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: GOODFELLOW M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. (Eds). **Actinomycetes in biotechnology**. London: Academic Press, 1988.

GOODAY, G. The ecology of chitin degradation. **Advances in Microbial Ecology**, v. 11, p. 387-430, 1990.

GOODAY, G.H., ZHU, W. Y., DONNELL, R.W. What are the roles of chitinases in the growing fungus? **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, p. 387-392, 1992.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

RAMÍREZ, P.; COHA, J.M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización e determinación de la actividad celulolítica. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 1, p. 67–77, 2003.

WATVE, M. G. et al. How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces? **Archives of Microbiology**, v. 176, p. 386–390, 2001.

WILLIAMS, S. T.; VICKERS, J. C. **The ecology of antibiotic production**. In: PEREIRA, J. C. Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 15p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118).