

ISABELLA CRISTINA RIBEIRO PERANTONI

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ACTINOBACTERIA DE  
SOLO E SUA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DA ENZIMA  
QUITINASE**

CUIABÁ  
MATO GROSSO - BRASIL  
2022

ISABELLA CRISTINA RIBEIRO PERANTONI

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ACTINOBACTERIA DE  
SOLO E SUA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DA ENZIMA  
QUITINASE**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Federal de  
Mato Grosso, campus de Cuiabá, como  
parte das exigências do Curso para  
obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Cuiabá  
MATO GROSSO - BRASIL  
2022

## SUMÁRIO

|                                                                     | Página |
|---------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO.....                                                         | 4      |
| ABSTRACT.....                                                       | 4      |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                  | 5      |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                       | 6      |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS                                               |        |
| 3.1 <i>Isolamento das actinobactérias</i> .....                     | 8      |
| 3.2 <i>Armazenamento dos isolados</i> .....                         | 9      |
| 3.3 <i>Caracterização morfológica</i> .....                         | 9      |
| 3.4 <i>Ensaio quitinolítico</i> .....                               | 9      |
| 4. RESULTADOS                                                       |        |
| 4.1 <i>Aspecto cultural e morfologia celular</i> .....              | 10     |
| 4.2 <i>Atividade quitinolítica de actinobactérias de solo</i> ..... | 16     |
| 5. DISCUSSÃO.....                                                   | 17     |
| 6. CONCLUSÕES.....                                                  | 18     |
| REFERÊNCIAS.....                                                    | 19     |

## RESUMO

Na agricultura, faz-se necessária a utilização de fontes de produtos naturais como alternativa ao uso de pesticidas e compostos químicos para o controle de pragas nas lavouras. Nesse sentido, as actinobactérias são micro-organismos produtores de uma variedade de metabólitos secundários com alto interesse farmacológico e comercial que promovem a bioprospecção das mesmas. Desse modo, em função da demanda mundial pungente por novas moléculas advindas de micro-organismos, este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar morfologicamente actinobactérias do solo e avaliar a sua atividade quitinolítica. As actinobactérias foram isoladas por meio da técnica de diluição seriada seguida pelo plaqueamento em spread plate, em meio de cultura Extrato de Solo. Treze grupos morfológicos distintos foram encontrados e os mesmos foram avaliados quanto à atividade quitinolítica por meio de ensaios de degradação da quitina. O halo de degradação da quitina foi observado para somente quatro cepas, sendo elas "ACT3", "ACT11", "ACT14" e "ACT19". Este trabalho permitiu a identificação de colônias de actinobactérias e a seleção de cepas degradadoras de quitina para serem utilizadas em futuros trabalhos de pesquisa.

**Palavras-chave:** Bioprospecção, metabólitos secundários, quitina

## ABSTRACT

In agriculture, it is necessary to use sources of natural products as an alternative to the use of pesticides and chemical compounds to control pests in crops. In this sense, actinobacteria are microorganisms that produce a variety of secondary metabolites with high pharmacological and commercial interest that promote their bioprospecting. Thus, due to the strong worldwide demand for new molecules from microorganisms, this work aimed to isolate and morphologically characterize actinobacteria from soil and evaluate their chitinolytic activity. The actinobacteria were isolated by means of the serial dilution technique followed by plating on spread plate, in Soil Extract culture medium. Thirteen distinct morphological groups were found and they were evaluated for chitinolytic activity through chitin degradation assays. The chitin degradation halo was observed for only four strains, namely "ACT3", "ACT11", "ACT14" and "ACT19". This work allowed the identification of colonies of actinobacteria and the selection of chitin-degrading strains to be used in future research work.

**Keywords:** Bioprospecting, secondary metabolites, chitin

## 1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que esforços estão sendo feitos para descobrir alternativas que reduzam o uso de defensivos químicos utilizados na agricultura e que, como menciona Bérdy (2005), assegurem uma agricultura mais produtiva e ambientalmente segura. Nesse sentido, compostos bioativos com base em micro-organismos estão sendo explorados. Dentre eles, o isolamento de actinobactérias tem recebido cada vez mais atenção da comunidade científica.

Atualmente o filo Actinobacteria abrange cinco classes, 19 ordens, 50 famílias e 221 gêneros (GOODFELLOW, 2012). Também, elas possuem alto teor de G+C em seu DNA (guanina + citosina) e apresentam rica diferenciação morfológica (LEWIN ET AL., 2016). Além disso, apresentam organização filamentosa como a dos fungos, no entanto, são indivíduos procariotos, com filamentos de um diâmetro inferior ao dos bolores eucarióticos (TORTORA ET AL., 2017).

São bactérias Gram-positivas, dispõem de uma parede celular rígida e espessa de peptidoglicano, contendo ácido murâmico, e alguns contêm ácidos teicóicos de parede (GOMES ET AL., 2018). Com relação a reprodução, as actinobactérias podem se reproduzir por fragmentação de hifas, e por meio de esporos (HAMED ET AL., 2017).

Podem formar fios ou hastes ramificadas, e suas hifas são geralmente não septadas (ANANDAN ET AL., 2016; GOMES ET AL., 2018). Em sua maioria, são quimio-organotróficos, e no que se refere à necessidade de oxigênio, as actinobactérias podem ser aeróbias ou anaeróbias (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006), e algumas crescem como anaeróbios facultativos (por exemplo a maioria dos membros da família Actinomycetaceae) (SCHAAL E YASSIN, 2012).

As actinobactérias compreendem ecossistemas terrestres e aquáticos, podendo apresentar-se como organismos acidófilos, alcalófilos, halófilos e alguns termófilos. Algumas são endofíticas (por exemplo *Frankia*), outras são patogênicas de animais (por exemplo *Actinomadura*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* e *Tropheryma* spp.), e algumas podem aparecer como habitantes do trato gastrointestinal (por exemplo *Bifidobacterium* e *Scardovia* spp.) (GOODFELLOW, 2012; ANANDAN ET AL., 2016).

As actinobactérias também são fonte importante na produção de fármacos. A estreptomicina por exemplo, foi um antibiótico produzido a partir do cultivo de cepas da actinobactéria *Streptomyces*, sendo eficaz contra a bactéria da tuberculose (TRABULSI E ALTERTHUM, 2015). Sendo assim, como discorre Bérdy (2005), compostos derivados do metabolismo primário ou secundário, são isolados de diversos seres vivos como base de produtos naturais. Por isto o interesse em micro-organismos, como as actinobactérias.

Esses organismos desempenham importante papel na ciclagem do carbono, segundo Anandan et al. (2016), são responsáveis pela degradação de todos os tipos de substâncias orgânicas, como celulose, polissacarídeos, gorduras proteicas, ácidos orgânicos e também

podem degradar moléculas recalcitrantes. Bem como atuam na decomposição subsequente do húmus no solo, além de produzirem uma série de metabólitos complexos, denominados geosminas, que dão o odor característico de terra (MADIGAN ET AL., 2016).

Ademais, sabe-se que actinobactérias produzem enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas da quitina. Dessa maneira, há a procura por cepas produtoras de enzimas de interesse biotecnológico, que possam servir como potenciais agentes de controle biológico. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar actinobactérias de solo e avaliar a capacidade de produção da enzima quitinase destas actinobactérias.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A morfologia é uma característica essencial na distinção de actinobactérias. Shirling e Gottlieb em 1966, traçaram métodos para a caracterização do gênero *Streptomyces*, determinando as características da superfície dos esporos e seus arranjos. Além da coloração da massa micelial.

Oliveira em 2003, isolou actinobactérias de resíduos em processo de compostagem, e relatou como uma de suas características, aparência pulverulenta e produção de hifas filamentosas e ramificadas. No mesmo trabalho, foi utilizada a técnica da coloração de Gram, onde observou formas fragmentadas no gênero *Nocardia* e formas filamentosas no gênero *Streptomyces*. As cores do micélio aéreo de actinobactérias, relatado no trabalho foram de branco, cinza, azul, rosa, marrom e creme.

Anandan et al. (2016), relatam o micélio aéreo de actinobactérias compreendendo estrutura algodoada, aveludada ou pulverulenta, com formações de anéis ou zonas concêntricas e pigmentação. O micélio substrato também pode apresentar forma e pigmentação diferentes.

Para a classificação mais detalhada de actinobactérias, são utilizadas ferramentas de microscopia de luz e eletrônica de varredura, crescimento em vários meios de cultura padrão para actinobactérias, e sequenciamento genético de rDNA 16S. Além de serem utilizados também, conhecimentos quimiotaxonômicos e taxonomia numérica para a identificação (SHIRLING E GOTTLIEB, 1966; SEMÊDO ET AL., 2001; SEMÊDO ET AL., 2004).

As actinobactérias são a fonte para a produção de cerca de 45% de aproximadamente, 10.000 dos metabólitos bioativos descobertos (BERDY, 2005; ARASU ET AL., 2016; ANANDAN ET AL., 2016). E para a obtenção de culturas de actinobactérias, devem ser considerados métodos de isolamento.

Maldonado et al. (2005), relatam que a diversidade de actinobactérias em ambientes marinhos pode ser evidenciada quando aplicados novos métodos seletivos para isolar novos táxons. Metodologias como filtração-aclimatação (HAHN ET AL., 2004), e diluição para extinção (SALCHER ET AL., 2015), como citados por Lipko e Belykh (2020), são utilizadas

para isolar actinobactérias de água doce. Para o isolamento de actinobactérias endofíticas, Coombs e Franco (2003), utilizaram raízes de trigo de vários locais no Sul da Austrália.

Gomes et al. (1999), utilizaram duas técnicas de isolamento, a dispersão e centrifugação diferencial (DDC) e a placa de diluição convencional para isolar actinobactérias do solo, o procedimento DDC se mostrou altamente significativo devido a eficácia na dissociação dos propágulos de actinobactérias dos agregados do solo.

A técnica de placa de diluição do solo é bem conhecida pelo isolamento e contagem de actinobactérias do solo (WILLIAMS E CROSS, 1971), e segundo Gotti (2018), baseia-se em preparar tubos com água esterilizada ou solução salina para a diluição da amostra, com o objetivo de diminuir a concentração de micro-organismos nas placas de Petri conforme as diluições avançam. A semeadura pode ocorrer por meio da técnica Spread Plate, um método de espalhamento uniforme de bactérias sobre a superfície do meio de cultura (WISE, 2006).

Para o isolamento seletivo de actinobactérias de solo solubilizadoras de quitina, Lingappa e Lockwood em 1961, utilizaram meio contendo quitina e visualizaram zonas claras no meio envolvendo a maioria das colônias. Reforçando o papel no uso de diferentes procedimentos de isolamento, para obtenção de cepas de actinobactérias.

A quitina, um polissacarídeo ligado a  $\beta$ -1,4 de *N*-acetilglucosamina está presente nas paredes celulares dos fungos, nos exoesqueletos de artrópodes, nas conchas externas de crustáceos e cascas de ovos de nematoides (BRZEZINSKA ET AL., 2014). As quitinases são enzimas que hidrolizam as ligações da quitina e são encontradas em espécies de todos os reinos (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN, 2010; LACOMBE-HARVEY ET AL., 2018).

Trabalhos com a utilização de actinobactérias degradadoras de quitina em aplicações em pupas ou larvas de insetos é relatado em literatura (GADELHAK ET AL., 2005; EL-KHAWAGH ET AL., 2011). Também, como relatado por Gomes et al. (2000), actinobactérias foram registradas com atividade quitinolítica pronunciada contra fungos fitopatogênicos.

Segundo Chaurasia et al. (2018), existem nove produtos disponíveis no mercado mundial obtidos de actinobactérias, além de dez substâncias ativas registradas como produtos comerciais. Os produtos Mycostop e Actinovate são utilizados como inibidores de patógenos fúngicos do solo e sementes, enquanto o Abamectin é utilizado como inseticida. Todos esses produtos derivados de estirpes de diferentes espécies do gênero *Streptomyces*.

A bioprospecção de novos micro-organismos para serem aplicados como agentes de controle biológico é de interesse crescente no campo da agricultura, pois protege a planta de fitopatógenos e pragas. Ademais, os compostos bioativos possuem importância ambiental, pois como citado por Araújo et al. (2008), podem aumentar a produção de alimentos e reduzir os efeitos ambientais, por serem de fácil degradação no meio ambiente e não prejudicarem a microbiota natural do solo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento das actinobactérias

As actinobactérias foram isoladas de quatro amostras de solo, sendo três de terra preta e uma de substrato comprado em loja. Todas as amostras foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Solo, situado na Faculdade de Agronomia e Zootecnia (FAAZ) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus de Cuiabá.

Para o isolamento e o cultivo das actinobactérias, utilizou-se o meio de cultura Extrato de Solo (ES) (PRAMER E SCHMIDT, 1964), composto por 0,5 g de fosfato de potássio bibásico ( $K_2HPO_4$ ); 0,1 g de nitrato de potássio ( $KNO_3$ ); 1 g de glicose; 100 mL de extrato de solo; 900 mL de água destilada e 15 g de ágar.

O preparo do extrato de solo utilizado como reagente para o meio de cultura, foi feito no béquer, adicionando 100 g de solo (com o mínimo de matéria orgânica) e 150 mL de água destilada, que foram levados ao micro-ondas e deixados ferver por três vezes durante 30 segundos. A suspensão foi retirada do micro-ondas entre as pausas para que não derramasse devido à fervura, e com o auxílio de um bastão de vidro foi misturada, para que então, por último, fosse deixada decantar e resfriar.

Posteriormente, retirou-se 100 mL do sobrenadante utilizando gases como filtro, para reter a matéria orgânica. O sobrenadante foi adicionado aos outros ingredientes, com exceção do ágar, o pH do material foi ajustado para 6,8 e em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

Para obtenção das colônias de actinobactérias foi realizada a técnica de Diluição Seriada em que, 10 g de cada amostra de solo foram homogeneizadas em 90 mL de solução salina esterilizada previamente. Com uma pipeta automática, retirou-se 1 mL da suspensão do solo e o adicionou em 9 mL de solução salina esterilizada em tubo de ensaio, considerando esta como diluição  $10^{-2}$ . Posteriormente, repetiu-se o procedimento por mais 2 vezes para obtenção da diluição  $10^{-4}$ .

Em seguida, foi inoculado 100  $\mu$ m da diluição  $10^{-4}$  em meio ES e aplicado a técnica de espalhamento em placa, Spread Plate, com o auxílio da alça de Drigalski. Esse procedimento foi repetido para os quatro tratamentos de solo, com cinco repetições do método de plaqueamento das diluições  $10^{-4}$  para cada amostra.

As placas foram vedadas com plástico filme PVC e colocadas de cabeça para baixo em câmara de crescimento tipo B.O.D. a 28 °C por sete dias. As colônias Gram-positivas, com características de actinobactérias, apresentando formas pulverulentas, algodonosas e aveludadas e formatos filamentosos e fragmentados, foram selecionadas e purificadas usando o método de estrias em meio de cultura ES. O odor característico de terra nas amostras também foi notado.



### **3.2 Armazenamento dos isolados**

As colônias de actinobactérias selecionadas foram acondicionadas em solução de glicerina 50%, em tubos plástico de 1,5 mL e armazenadas em freezer à temperatura de -20 °C. Também foram armazenadas em meio de cultura inclinado, em tubo de vidro com rosca. Em cada tubo adicionou-se 3 mL de meio de cultura ES.

Os tubos contendo o meio de cultura foram esterilizados, retirados da autoclave, colocados inclinados no fluxo para secar e após a solidificação do meio de cultura, com o auxílio da alça de platina, os isolados foram inseridos no meio de cultura e levados para a incubadora a 28 °C, por quatorze dias. Logo após, os tubos foram preenchidos com glicerina a 50% e levados para a geladeira a 5 °C.

### **3.3 Caracterização morfológica**

Os isolados obtidos foram multiplicados pelo método de estrias em meio de cultura ES e mantidos em câmara de crescimento tipo B.O.D. B.O.D a 28 °C por sete dias para ser feita a caracterização morfológica. Inicialmente, observou-se o aspecto morfológico das colônias em lupa, e posteriormente, foi feito a coloração de Gram.

A coloração de Gram, permitiu, além da diferenciação entre gram-positivas e negativas, a observação do formato das células. Os isolados que apresentaram as mesmas características morfológicas, como coloração e formato celular, foram consideradas iguais, e agrupadas em um mesmo morfotipo.

### **3.4 Ensaio quitinolítico**

Para avaliar o potencial de degradação da quitina, pequenas porções das culturas de actinobactérias com sete dias de crescimento em meio ES foram transferidas com ponteiras esterilizadas para o centro da placa de Petri contendo quitina coloidal, preparada seguindo metodologia de Souza et al. (2009).

Para o preparo de quitina coloidal adicionou-se 5 g de pó de quitina de cascas de caranguejo (C7170, Sigma-Aldrich Co., EUA) a 60 mL de Ácido Clorídrico (HCl) 37% P.A./ACS em Erlenmeyer, e em seguida, a mistura foi levada a um agitador magnético por 2 horas e 30 min em temperatura ambiente. Depois, foi adicionado à mistura, 200 mL de Álcool Etílico Absoluto P.A. (Etanol) gelado e então, deixou-a por uma noite no agitador magnético. O preparo foi feito em capela de exaustão.

No dia seguinte, o material foi colocado em tubos de vidro e levados à centrífuga a 5000 rpm por 20 min a 4 °C. Posteriormente, o precipitado foi transferido para um Erlenmeyer com um funil de vidro e papel filtro 80 g/m<sup>2</sup>, e fez-se a lavagem da quitina coloidal com 8 L de água destilada esterilizada até seu pH se tornar neutro (7,0).

A quitina coloidal foi retirada do papel filtro e utilizada para incrementar o meio Ágar

de Quitina Coloidal (CCA) (GUPTA ET AL., 1995). Este meio foi composto por 15 g de quitina coloidal; 0,5 g de extrato de levedura; 1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,3 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 1,36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 6,8 adicionando NaOH como solução básica ou HCl como solução ácida.

Após a inoculação dos isolados de actinobactérias no meio CCA, os mesmos foram colocados à 28 °C em câmara de crescimento tipo B.O.D. por sete dias para a observação da capacidade de produção de quitinase pelos isolados. A leitura foi realizada com a observação da presença de halo transparente em torno da colônia ou ausência de halo. Os isolados considerados positivos para a produção da enzima quitinase foram aqueles que apresentaram halo ao redor da cepa, independentemente do diâmetro do halo. Indicando a degradação da quitina presente no meio.

## **4. RESULTADOS**

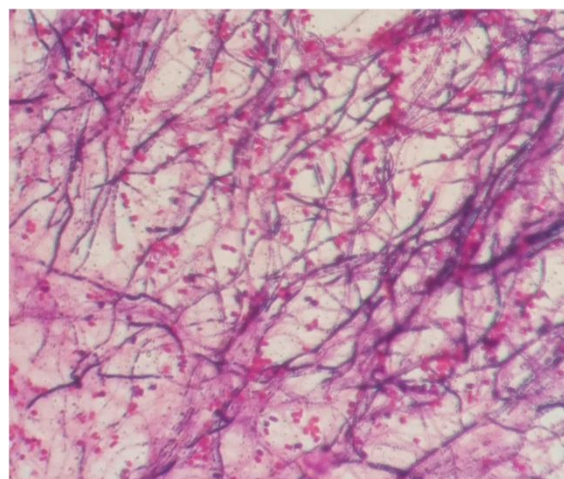
### **4.1 Aspecto cultural e morfologia celular**

Com a técnica de isolamento utilizada neste trabalho foi possível selecionar 60 micro-organismos que foram repicados e analisados quanto as suas características morfológicas. Destes, 27 foram mantidos e agrupados de acordo com a frequência de morfotipos. Treze morfotipos foram encontrados e estão representados pelas cepas “ACT3”, “ACT7”, “ACT11”, “ACT14”, “ACT15”, “ACT18”, “ACT19”, “ACT23”, “ACT40”, “ACT42”, “ACT48”, “ACT58” e “ACT60” (Figura 1).

O aspecto das colônias variou em colônias pulverulentas, algodonosas e aveludadas. Entre os isolados, quatro produziram massa de esporos bege, dois produziram massa de esporos cinza, dois de cor salmão, dois verdes claro, um branco, um marrom e um branco e cinza. Com predominância da coloração bege. A morfologia celular das cepas revelou formas filamentosas e formatos celulares de bacilos e cocos.

**Morfologia da colônia****Coloração de Gram**

ACT3 Micélio Aéreo

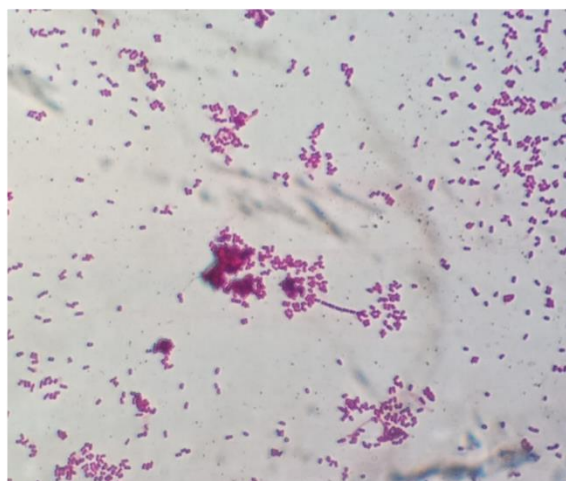


ACT3 Aumento 1000x

Micélio aéreo bege, aspecto algodonofo. Presença de hifas filamentosas e ramificadas.



ACT7 Micélio Aéreo

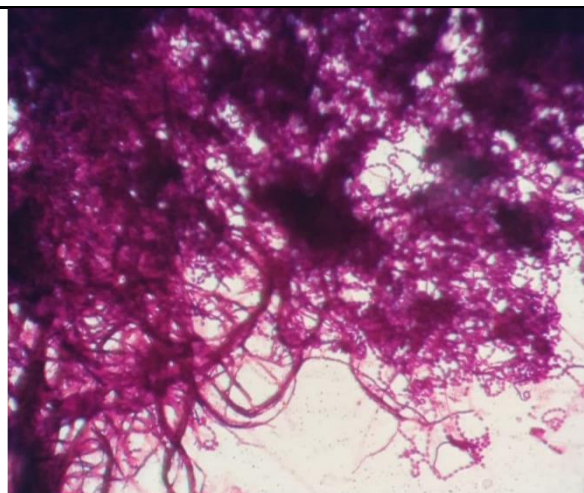


ACT7 Aumento 1000x

Micélio aéreo cinza, aspecto algodonofo. Presença de cadeia de cocos, diplococos e cocos livres.



ACT11 Micélio Aéreo



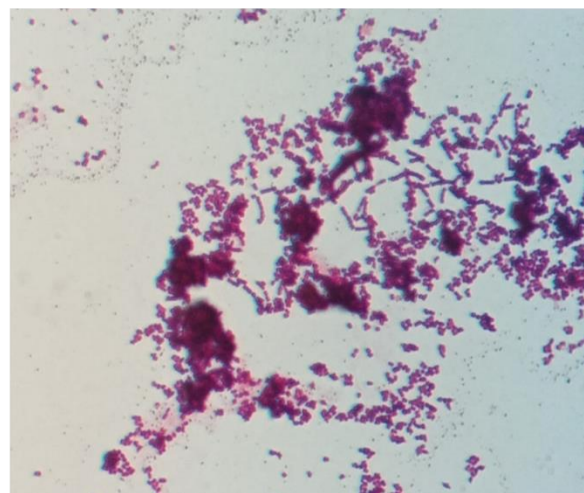
ACT11 Aumento 1000x

Micélio aéreo bege, aspecto pulverulento. Presença de emaranhado de hifas e cadeias de cocos.

---



ACT14 Micélio Aéreo

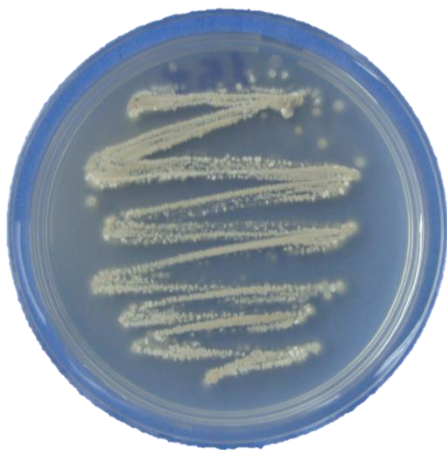


ACT14 Aumento 1000x

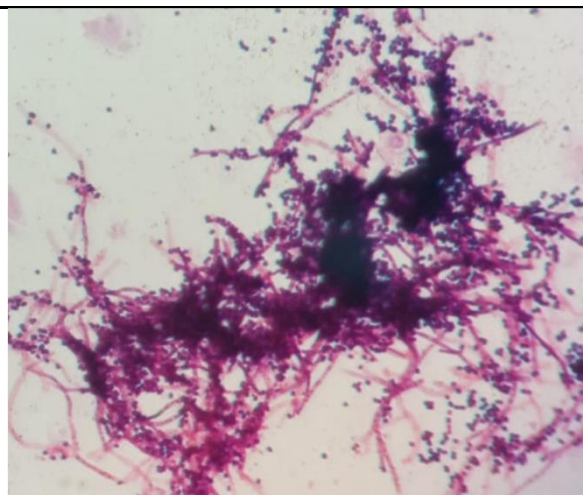
Micélio aéreo verde claro, aspecto aveludado. Presença de cadeias de cocos, diplococos e cocos livres.

---





ACT15 Micélio Aéreo

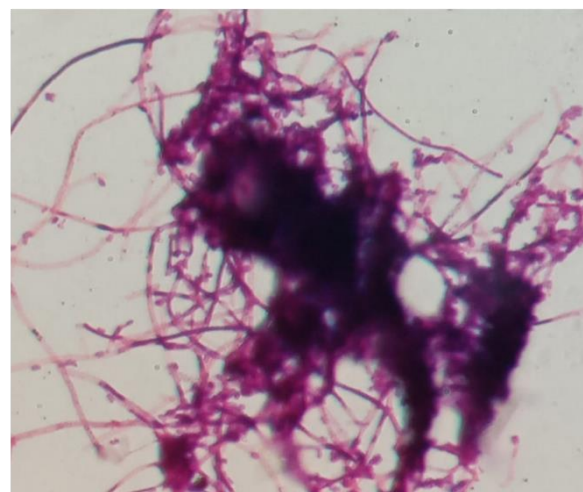


ACT15 Aumento 1000x

Micélio aéreo bege, aspecto algodonofo. Presença de emaranhado de hifas e cocos.



ACT18 Micélio Aéreo

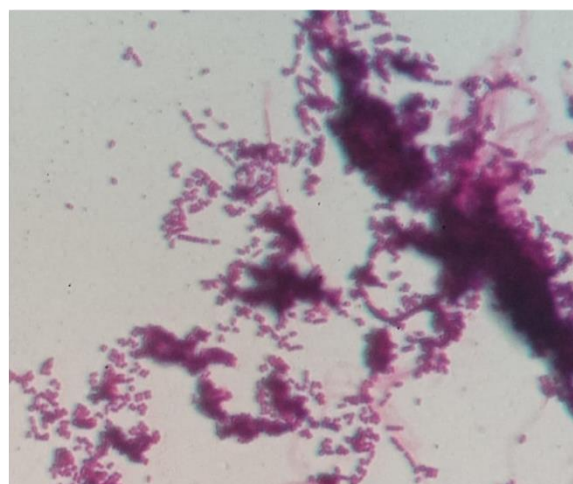


ACT18 Aumento 1000x

Micélio aéreo bege, aspecto aveludado. Presença de emaranhado de hifas.



ACT19 Micélio Aéreo



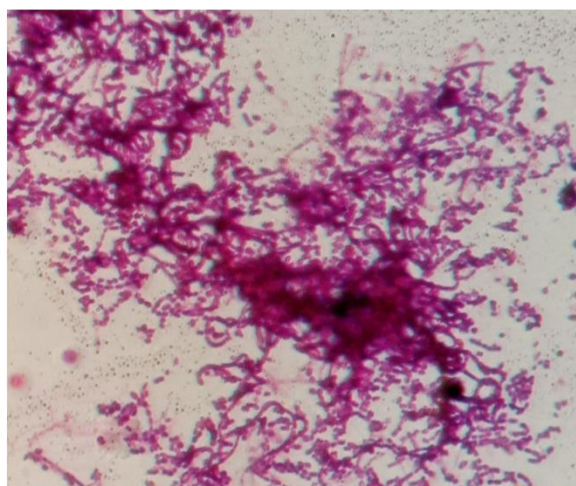
ACT19 Aumento 1000x

Micélio aéreo verde claro, aspecto aveludado. Presença de filamentos e cocos.

---



ACT23 Micélio Aéreo



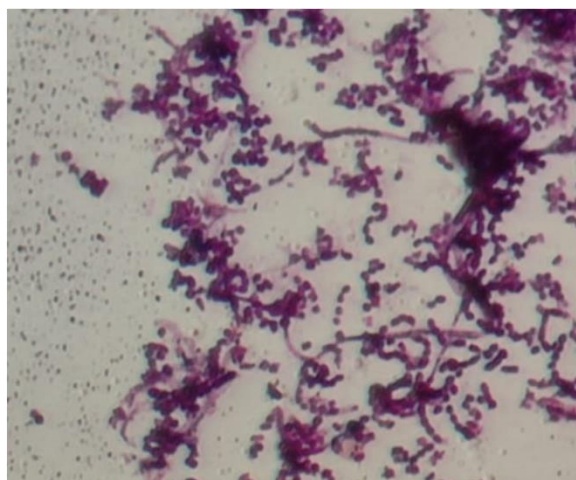
ACT23 Aumento 1000x

Micélio aéreo branco, aspecto pulverulento. Presença de hifas filamentosas e cocos.

---



ACT40 Micélio Aéreo



ACT40 Aumento 1000x

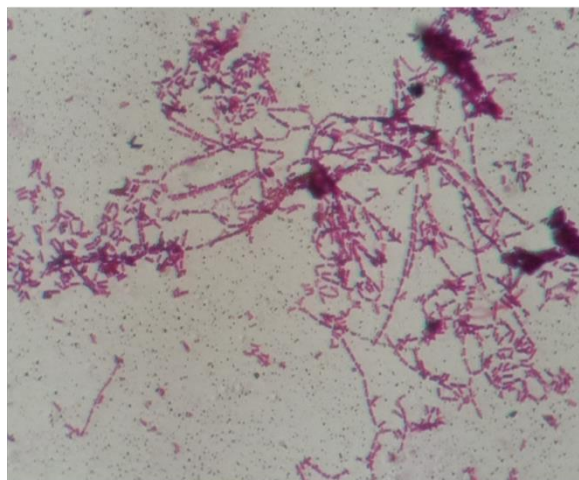
Micélio aéreo cinza, aspecto pulverulento. Presença de hifas filamentosas e cocos.

---





ACT42 Micélio Aéreo

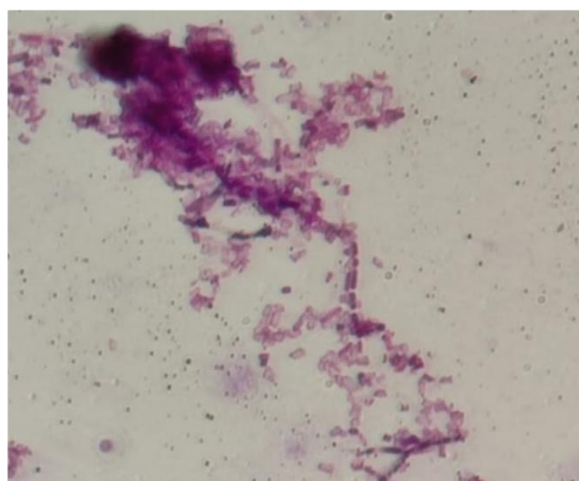


ACT42 Aumento 1000x

Micélio aéreo salmão, aspecto aveludado. Presença de bacilos.



ACT48 Micélio Aéreo

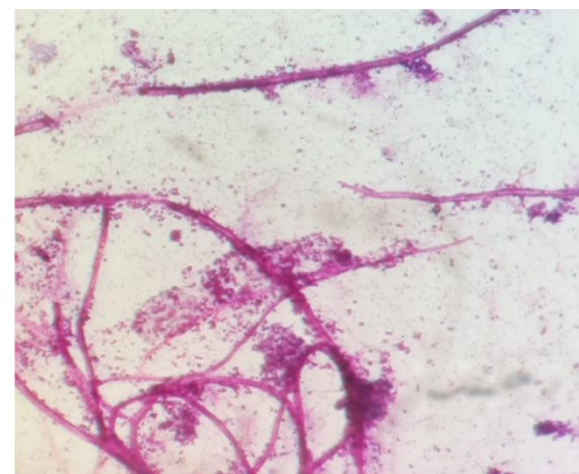


ACT48 Aumento 1000x

Micélio aéreo salmão, aspecto aveludado. Presença de bacilos.



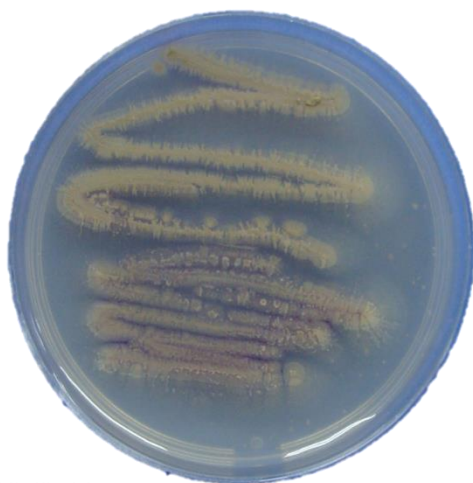
ACT58 Micélio Aéreo



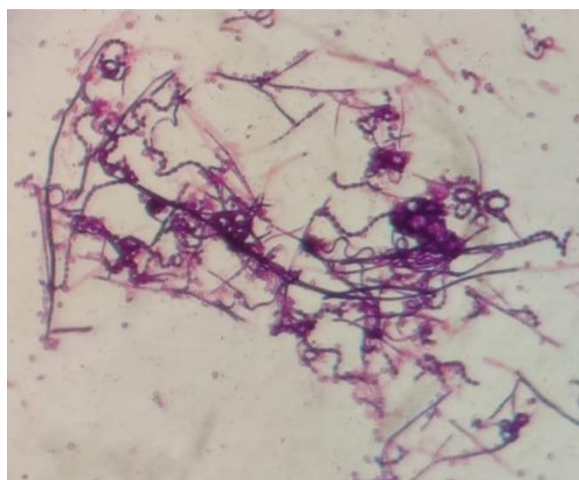
ACT58 Aumento 1000x

Micélio aéreo branco e cinza, aspecto pulverulento. Presença de hifas filamentosas.

---



ACT60 Micélio Aéreo



ACT60 Aumento 1000x

Micélio aéreo marrom, aspecto pulverulento. Presença de hifas filamentosas e cadeias de COCOS.

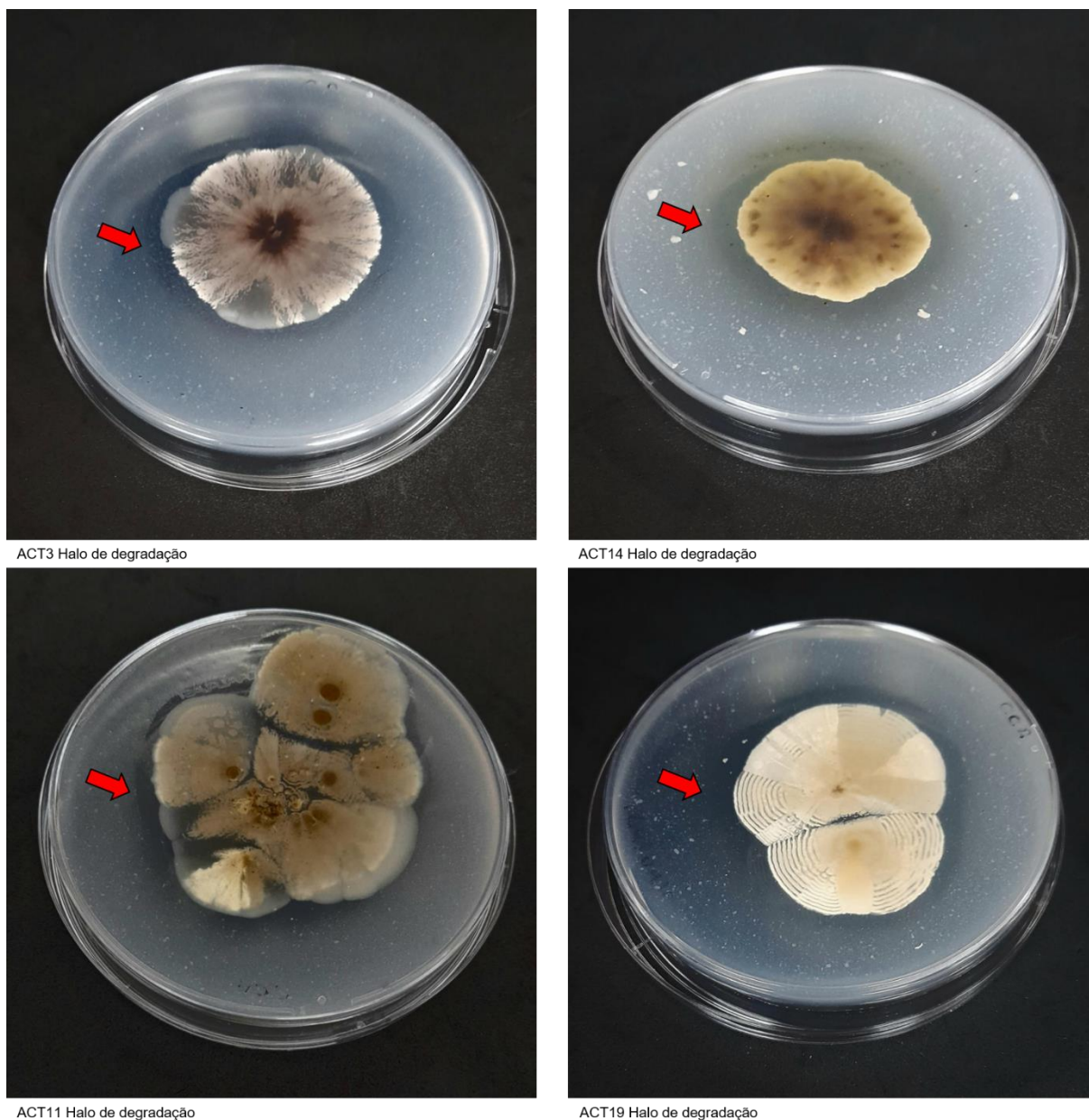
---

**Figura 1.** Morfologia de colônia e coloração de Gram de actinobactérias de solo.

#### **4.2 Atividade quitinolítica de actinobactérias de solo**

Das treze cepas, apenas “ACT3”, “ACT11”, “ACT14” e “ACT19” foram selecionadas com base na produção da enzima quitinase. Os resultados positivos com relação à capacidade de degradação de actinobactérias de solo isoladas no estudo, são apresentados na Figura 2.





**Figura 2.** Placas de CCA com presença de zonas claras de produção de enzima quitinase.

## 5. DISCUSSÃO

A heterogeneidade de cores da massa de micélio aéreo, encontradas no estudo, também foram vistas por Silva et al. (2019), que isolaram do solo no semiárido nordestino, colônias de colorações cinza, marrom e branca de actinobactérias. No presente trabalho, foi observado colônias com o aspecto aveludado e pulverulento, assim como Sousa et al. (2019), que observaram ao isolar actinobactérias de solo rizosférico, colônias com aspecto velutino e pulverulento, além de coloração variando entre branco e cinza.

Augustine (2014) isolou actinobactérias de sedimentos marinho, revelando texturas pulverulentas, algodonas, aveludadas, e coriáceas para as colônias de actinobactérias. Além de cores como branco/esbranquiçado, cinza, amarelo, verde e rosa/vermelho. Ademais, como foi observado no processo de caracterização no presente trabalho, as cepas

apresentaram formatos esféricos, em bastonetes, e filamentosos.

Azuma (2011), caracterizou actinobactérias de sedimentos superficiais em região entre-marés e visualizou entre as amostras, isolados apresentado emaranhado de finos filamentos que se fragmentavam em formas bacilares e esféricas. Santos et al. (2019), selecionaram cepas de actinobactérias do solo, e identificaram formatos cocóides, filamentos fragmentados, e hifas filamentosas em cepas de actinobactérias. Também, mencionam que o gênero predominante foi *Streptomyces*.

Semêdo et al. (2001), relata que *Streptomyces* é o gênero de actinobactéria mais comum em solos, correspondendo a até 90% dos isolados. Ademais, Silva (2010), isolou actinobactérias de compostagem e observou formato de hifas extensas e ramificadas para actinobactérias, e algumas com fragmentação em formato de bacilos, identificadas neste caso, como *Nocardia*.

No presente estudo, foi observado a presença somente de hifas não septadas entre os isolados, assim como observado por Ichiwaki (2017), que relatou o mesmo para actinobactérias isoladas de amostras de água e sedimento da bacia do Rio Tietê. Além do mais, observou-se aqui, apenas quatro cepas com sucesso em degradar a quitina.

Segundo Lacombe-Harvey et al. (2018, p. 7220), “existem organismos que possuem genes que codificam enzimas quitinolíticas, mas não crescem em meios de cultura contendo quitina” e para os que degradam em meio sólido contendo quitina, indicam que seu crescimento depende, pelo menos parcialmente, de sua capacidade de solubilizar a quitina. A quitina pode ser utilizada como fontes de carbono e nitrogênio pela actinobactéria.

Desse modo, substâncias bioativas continuam sendo cada vez mais, buscadas em actinobactérias para uso biotecnológico. No presente estudo, baseando-se em características e aspecto cultural das colônias, treze cepas foram indicadas como possíveis pertencentes ao filo Actinobacteria, revelando mais uma vez, a variedade na morfologia e pigmentação do grupo.

## 6. CONCLUSÕES

Neste estudo, treze cepas de actinobactérias foram isoladas e apresentaram diversidade de cores de micélio aéreo e formatos celulares. Quanto à capacidade de degradação da quitina, quatro cepas demonstraram produção da enzima quitinase através da formação de halos transparentes ao redor da colônia, são elas “ACT3”, “ACT11”, “ACT14” e “ACT19”. Ainda, é necessário classificar a níveis mais específicos da taxonomia os isolados estudados. Esse trabalho oferece subsídio para trabalhos futuros envolvendo as cepas estudadas.

## REFERÊNCIAS

- AUGUSTINE, D. **Actinomycete isolates from Arabian Sea and Bay of Bengal: biochemical, molecular and functional characterization**. 2014. Tese de doutorado (Department of Marine Biology, Microbiology and Biochemistry) - Cochin University of Science and Technology, Kochi, p. 39-41, 2014.
- ARAÚJO, J.; CALAZANS, G. M. T.; DE MELO, I. S. Importância de actinobactérias para a agricultura. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, p. 277-296, 2008.
- ANANDAN, R.; DHARUMADURAI, D.; MANOGARAN, G. P. An introduction to actinobacteria. In: **Actinobacteria-basics and biotechnological applications**, Intechopen, p. 3-37, 2016.
- ARASU, M. V.; ESMAIL, G. A.; AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K. Managing pests and diseases of grain legumes with secondary metabolites from actinomycetes. In: **Plant growth promoting actinobacteria**, Springer, p. 83-98, 2016.
- AZUMA, M. V. P. **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel**. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 77-82, 2011.
- ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 2, p. 201-216, 2010.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites, a personal view. **The journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U.; BURKOWSKA, A.; WALCZAK, M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. **Current microbiology**, v. 68, n. 1, p. 71-81, 2014.
- COOMBS, J. T.; FRANCO, C. M. M. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5603-5608, 2003.
- CHAURASIA, A.; MEENA, B. R.; TRIPATHI, A. N.; PANDEY, K. K.; RAI, A. B.; SINGH, B. Actinomycetes: an unexplored microorganism for plant growth promotion and biocontrol in vegetable crops. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 1-16, 2018.
- EL-KHAWAGH, M. A.; HAMADAH, K. S.; EL-SHEIKH, T. M. The insecticidal activity of actinomycete metabolites, against the mosquito *Culex pipiens*. **Egyptian academic journal of biological sciences**, v. 4, n. 1, p. 103-113, 2011.

GADELHAK, G. G.; EL-TARABILY, K. A.; AL-KAABI, F. K. Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. **International journal of agriculture & biology**, v. 7, n. 4, p. 627-633, 2005.

GOMES, R. C.; SEMÊDO, L. T. A. S.; LINHARES, A. A.; GUIMARÃES, A. C. C.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. Efficiency of the dispersion and differential centrifugation technique in the isolation of chitinolytic actinomycetes from soil. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 47-50, 1999.

GOMES, R. C.; SEMEDO, L. T. A. S.; SOARES, R. M. A.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. 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.

GOMES, E. B.; DIAS, L. R. L.; MIRANDA, R. C. M. Actinomycetes bioactive compounds: Biological control of fungi and phytopathogenic insect. **African journal of biotechnology**, v. 17, n. 17, p. 552-559, 2018.

GOODFELLOW, M. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In: **Bergey's manual® of systematic bacteriology**, Springer New York, p. 33-2028, 2012.

GOTTI, I. A. Microbiologia agrícola. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., p. 41-42, 2018.

GUPTA, R.; SAXENA, R. K.; CHATURVEDI, P.; VIRDI, J. S. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. **Journal of applied bacteriology**, v. 78, n. 4, p. 378-383, 1995.

HAZARIKA, S. N.; THAKUR, D. Actinobacteria. In: **Beneficial microbes in agro-ecology**. Academic Press, p. 443-476, 2020.

HAMEDI, J.; POORINMOHAMMAD, N.; PAPIRAN, R. Growth and life cycle of Actinobacteria. In: **Biology and biotechnology of Actinobacteria**, Springer, p. 29-50, 2017.

HAHN, M. W.; STADLER, P.; WU, Q. L.; PÖCKL, M. The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. **Journal of microbiological methods**, v. 57, n. 3, p. 379-390, 2004.

ICHIWAKI, S. **Caracterização e identificação de linhagens de actinomicetos isoladas de amostras de água e sedimento da bacia do rio Tietê**. 2017. Tese de Doutorado (Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 65-68, 2017.

LACOMBE-HARVEY, M.; BRZEZINSKI, R.; BEAULIEU, C. Chitinolytic functions in

actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 17, p. 7219-7230, 2018.

LEWIN, G. R.; CARLOS, C.; CHEVRETTE, M. G.; HORN, H. A.; MCDONALD, B. R.; STANKEY, R. J.; FOX, B. G.; CURRIE, C. R. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual review of microbiology**, v. 1, n. 70, p. 235-254, 2016.

LIPKO, I. A.; BELYKH, O. I. Environmental features of freshwater planktonic Actinobacteria. **Contemporary problems of ecology**, v. 14, n. 2, p. 158-170, 2021.

LI, Q.; CHEN, X.; JIANG, Y.; JIANG, C. Morphological identification of Actinobacteria. In: **Actinobacteria-basics and biotechnological applications**, Intechopen, p. 59-86, 2016.

LINGAPPA, Y.; LOCKWOOD, J. L. A chitin medium for isolation, growth and maintenance of actinomycetes. **Nature**, v. 189, n. 4759, p. 158-159, 1961.

LOAIZA, A. M. S.; GUERRERO, C. A. O.; SERNA, D. H.; PULGARIN, L. M. C.; PÉREZ, K. P.; NÚÑEZ, J. R. R.; LOPEZ, L. B. Actinomicetos aislados del suelo del Jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. **Scientia et technica**, v. 19, n. 2, p. 223-229, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed., Porto Alegre: Artmed, p. 503, 2016.

MALDONADO, L. A.; STACH, J. E.; PATHOM-AREE, W.; WARD, A. C.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 87, n. 1, p. 11-18, 2005.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed., Lavras: UFLA, p. 54-63, 2006.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. 2003. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 55-66, 2003.

PRAMER, D.; SCHIMDT, E. L. Bacteria and actinomycetes by the dilution plate method. In: **Experimental Soil Microbiology**, Burgess publishing co. minneapolis, p. 35-37, 1964.

SANTOS, F. D. D.; OLIVEIRA, M. P.; MENESES, A. C. M. A. D.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Morfologia de cepas de actinobactérias em áreas suscetíveis à desertificação. **Enciclopédia biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1911-1924, 2019.

SALCHER, M. M.; NEUENSCHWANDER, S. M.; POSCH, T.; PERNTHALER, J. The ecology of pelagic freshwater methylotrophs assessed by a high-resolution monitoring and isolation

campaign. **The ISME journal**, v. 9, n. 11, p. 2442-2453, 2015.

SEMÊDO, L. T. A. S.; LINHARES, A. A.; GOMES, R. C.; MANFIO, G. P.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Research in microbiology**, v. 155, n. 4, p. 291-299, 2001.

SEMÊDO, L. T. A. S.; GOMES, R. C.; LINHARES, A. A.; DUARTE, G. F.; NASCIMENTO, R. P.; ROSADO, A. S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R.; SILVA, K. R. A.; ALVIANO, C. S.; MANFIO, G. P.; SOARES, R. M. A.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1323-1328, 2004.

SILVA, L. C. B. **Identificação de actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. isolados do processo de compostagem para a produção de *Agaricus brasiliensis***. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 7-10, 2010.

SILVA, G. R. **Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* tul. do bioma Caatinga**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 29-32, 2013.

SILVA, M. J.; SOUSA, J.; MARTINS, S. C.; MARTINS, C. Diversidade de cepas de actinobactérias da RPPN “Fazenda não me deixes” - Quixadá (CE). **Enciclopédia biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1857-1869, 2019.

SOUZA, C. P.; BURBANO-ROSETO, E. M.; ALMEIDA, B. C.; MARTINS, G. G.; ALBERTINI, L. S.; RIVERA, I. N. G. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 2079-2082, 2009.

SOUZA, S. F.; LIBERAL, T. C. F.; SOUSA JÚNIOR, J. J. V.; SANTOS, B.V.L.; FABIAN, M. Z.; SANTANA, R. C. F.; ARAÚJO, J. M.; TSAI, S. M.; RABELO, S. K. S. *Streptomyces* sp. isolados da Amazônia como agentes de biocontrole de fungos aflatoxigênicos. In: **Diversidade microbiana da Amazônia**, INPA, p. 46-49, 2019.

SCHAAL, K. P.; YASSIN, A. F. Family I. Actinomycetaceae. In: **Bergey's manual® of systematic bacteriology**, Springer New York, p. 33-2028, 2012.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species<sup>1</sup>. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, p. 311-312, 2017.



TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed., São Paulo: Atheneu, p. 483-484, 2015.

WILLIAMS, S. T.; CROSS, T. Chapter XI actinomycetes. In: **Methods in microbiology**. Academic Press, p. 295-334, 1971.

WISE, K. Preparing spread plates protocols. **American Society for microbiology, 2006**.