

CAPÍTULO VII

ACTINOBACTÉRIAS

Ida Chapaval Pimentel
Jair Alves Dionísio
Diana Signor

Os actinomicetos, atualmente denominados actinobactérias (BRENNER et al., 2004), são classificados dentro do Filo e da Classe Actinobacteria, que compreendem seis ordens, 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies. As actinobactérias compartilham duas características: todas são Gram positivas e apresentam alta razão de G + C (guanina/citosina) em seu DNA, podendo exceder 70 % do total de bases nucleotídicas, variando de 51 % em *Corynebacterias* a mais de 70 % em *Streptomyces* e *Frankias*. Podem ser aeróbias, microaerófilas ou anaeróbias (LACAZ et al., 2002).

Actinobactérias apresentam grande variedade morfológica, podendo ser cocoides (*Micrococcus*) ou cocobacilos (*Arthrobacter*), outros em forma de hifas curtas e rudimentares (*Nocardia* spp.) e, ainda, alguns com micélio ramificado (*Streptomyces* spp.) (VENTURA et al., 2007). Também, exibem diversas propriedades fisiológicas e metabólicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabólitos secundários. A maioria dos antibióticos utilizados atualmente são derivados de produtos naturais de actinobactérias e fungos (RAJU et al., 2010). Também, exibem diversas propriedades fisiológicas e metabólicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabólitos secundários (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As actinobactérias possuem diferentes estilos de vida, assim o Filo inclui os patógenos humanos (*Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp. e *Propionibacterium* spp.), os habitantes do solo (*Streptomyces* spp.), os comensais de plantas (*Leifsonia* spp.), as fixadoras de nitrogênio simbiotes (*Frankia*) e as do trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp.) (VENTURA et al., 2007).

As actinobactérias produzem elementos filamentosos em forma de micélio, semelhantes a hifas fúngicas (SCHLEGEL, 1993). Em algumas espécies, reproduzem-se pela formação de esporos, esporangiósporos ou conidiósporos. Os esporos constituem a sua principal forma de multiplicação, são resistentes a dessecções e podem auxiliar na sobrevivência das espécies durante a estiagem. Em

outros gêneros, como o *Nocardia*, a reprodução ocorre por meio da fragmentação das hifas em muitas células baciliformes e cocoides, cada uma capaz de formar um novo micélio (VENTURA et al., 2007).

A presença de actinobactérias *Streptomyces coelicoler* no solo é constatada pelo cheiro de terra molhada, que se deve à produção de geosmina, um álcool terciário (1,10-dimetil-9-decalol) que se acumula nos poros do solo (SIQUEIRA, 1993). Esse composto pode representar problemas para a aquicultura, indústria de alimentos, bebidas e água potável, pois o olfato humano pode detectá-la mesmo em baixas concentrações (4 a 15 ng L⁻¹) (CHAVEZ et al., 2011).

São predominantemente heterotróficas e utilizam fontes de carbono orgânico, que é utilizado desde as moléculas mais simples até as mais complexas não decompostas por fungos e bactérias como: fenóis, quitina, parafinas e húmus. São capazes de decompor matéria orgânica em temperaturas mais elevadas, como em compostagens e esterqueiras, e de degradarem celulose e proteínas com pequena imobilização de nitrogênio (RAMÍREZ; COHA, 2003). São fracos competidores em relação às bactérias e fungos, pois estes dois grupos são os primeiros decompositores que atacam com maior rapidez os resíduos orgânicos frescos adicionados ao solo, enquanto as actinobactérias aparecem em segundo plano e atacam os compostos de maior resistência (CAMPBELL; BIEDERBECK, 1982).

O pH é fator determinante para a maioria das espécies, sendo ótimo entre 6,5 e 8,0 e limitante para a maioria das espécies em 5,5. Valores de pH superiores a 5,5 favorecem o aparecimento da sarna comum da cultura da batata, importante doença causada por actinobactérias do solo (13 espécies de *Streptomyces*). Dentre as medidas de controle recomendadas para *S. scabies*, destacam-se: o uso de batatas-plantas saudáveis, a rotação de culturas com gramíneas, a manutenção do pH do solo abaixo de 5,5 e evitar o déficit hídrico durante a tuberização (FISCHER, 2007).

Os representantes do gênero *Frankia* vivem em simbiose com as raízes de plantas superiores de oito famílias pertencentes a sete ordens, envolvendo 24 gêneros e 279 espécies, distribuídas em todos os continentes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A simbiose leva à formação de nódulos, no interior dos quais ocorre a fixação de nitrogênio, semelhante à fixação que ocorre entre rizóbios e leguminosas. As espécies actinorrizas compreendem desde ervas e arbustos até árvores dos gêneros: *Casuarina*, *Myrica*, *Alder* e *Eleagnus*, entre outros (AKKERMANS et al., 1992).

Dias-Júnior et al. (1998), avaliando o efeito da contaminação dos rejeitos de zinco sobre a população microbiana do solo, observaram que nos tratamentos:

a) com cobertura vegetal predominante de *Brachiaria decumbens*, sobre Latossolo Vermelho-Amarelo plântico; b) com cobertura vegetal predominante de *Andropogon* sp., *Trema micrantha* e *Inga* sp. sobre Latossolo Vermelho, as densidades (UFC g⁻¹) de solo seco, de actinobactérias foram de 37,7 x 10⁴ e 113 x 10⁴, respectivamente.

As actinobactérias são decompositoras de alguns componentes resistentes de tecidos animais e vegetais, contribuem para a formação do húmus, causam doenças em plantas (*Streptomyces scabies*) e animais (*Nocardia asteroides*), fixam N₂ e regulam a comunidade microbiana (TSAVKELOVA, 2007), como também são indicadoras da qualidade do solo.

PROTOCOLO V

CONTAGEM DE ACTINOBACTÉRIAS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE

1. Material

- a) Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- b) Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, tubos de ensaio (16 x 1,5 cm) com rosca, placas de Petri (Ø 90 mm), alça de Drigalsky e esferas de vidro (Ø 2,00 mm);
- c) Equipamentos: agitador de frasco, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, banho-maria, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina e agitador de tubos; e,
- d) Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %) e meio de cultura caseinato-dextrose-ágar (Tabela 8);
- e) Outros: funil de plástico (Ø 10,0 cm), micropipeta de volume variável (10 a 100 µL), ponteiras autoclaváveis, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), parafilm, lixeira para resíduos biológicos, luvas de proteção (nitrílica descartável) e gás butano; e,
- f) Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

Tabela 8. Meio de cultura caseinato-dextrose-ágar (CLARK, 1965).

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
Amido	10,0
Caseína	0,3
KNO ₃	2,0
NaCl	2,0
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Ágar	15,0
Água destilada q.s.p.	1.000,0

Obs. Ajustar o pH para 6,5 ou 6,6, com HCl diluído, antes da adição do ágar.

2. Metodologia

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido, previamente tamizado, em peneira número 10, em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de fungos e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Transferir o solo, com um funil, para um Erlenmeyer de 250 mL contendo cinco esferas de vidro e 90,0 mL de solução salina esterilizada (Anexo 1) (diluição 1:10);
- c) Aquecer, em banho-maria a 50 °C, por 15 minutos;
- d) Dispersar as unidades formadoras de colônias (UFC) em agitador mecânico (usar \cong 3,4 G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- e) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar, no agitador de tubos ou manualmente, cinco vezes (diluição 1:100);
- f) Transferir com uma micropipeta, contendo outra ponteira esterilizada, 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar manualmente cinco vezes (diluição 1:1.000);
- g) Repetir o item “e” duas vezes consecutivas para atingir as diluições 1:10.000 e 1:100.000;
- h) Após cada transferência, descartar a ponteira utilizada em um béquer contendo solução de detergente (Anexo 1);
- i) Pipetar, com ponteiras diferentes, 0,1 mL das etapas “f” e “g” e transferir para placas de Petri contendo o meio de cultura caseinato-dextrose-ágar (Tabela 8);
- j) Espalhar o inóculo na superfície do meio específico com o auxílio da alça de Drigalsky, tomando o cuidado de esterilizá-la por flambagem, inserindo-a em álcool etílico (95 ou 96° GL) e passando-a imediatamente na chama da lamparina. Repetir o processo, após o uso em cada placa de Petri;
- k) Identificar corretamente as placas de Petri, selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, durante uma semana;
- l) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- m) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

3. Cálculo

Realizar o cálculo conforme descrito no Capítulo III (p. 22).

4. Resultados

Preencher os dados conforme Tabela 4 (p. 22).