

Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia

Arlem Nascimento de OLIVEIRA¹, Nathália Siqueira FLOR², Luiz Antonio de OLIVEIRA³

RESUMO

Poucas são as informações referentes ao perfil enzimático de bactérias rizobiais. Em meio de cultura solidificado, foi conduzido um experimento em fatorial 7 x 3 x 3 para avaliar o efeito do pH (5,0; 6,5 e 8,0) e da temperatura (25, 35 e 42 °C) sobre a atividade amilolítica de sete isolados de rizóbio. As maiores atividades amilolíticas foram observadas em ambientes ácidos, com algumas bactérias também produzindo níveis significativos em pH 8,0. Entre as interações significativas ($P < 0,01$), os isolados INPA R-110 e R-822 apresentaram máximas atividades em pH 5,0 e 25 °C, com o R-822 também sendo um bom produtor de amilase nas temperaturas de 35 e 42 °C. Em termos gerais, os isolados INPA R-110 e R-822 foram os melhores produtores de amilases, com atividades enzimáticas maiores do que 2,0.

PALAVRAS-CHAVE: Amilases extracelulares, meio sólido, pH, temperatura

Influence of pH and temperature on amylolytic activity of rhizobia isolated from Amazonian soils

ABSTRACT

Information is scarce regarding the enzymatic profiles of rhizobia bacteria. On solid medium, a 7 x 3 x 3 factorial experiment was conducted to evaluate the effect of pH (5.0, 6.5 and 8.0) and temperature (25, 35 and 42 °C) on amylase activities of seven rhizobia strains. The highest enzymatic activities were found in acid environments, with some bacteria also producing significant levels at pH 8.0. Among the significant interactions ($P < 0.01$), INPA strains R-110 and R-822 exhibited maximum activities at pH 5.0 and 25 °C, with the R-822 being also a good amylase producer at 35 and 42 °C. In general terms, INPA strains R-110 and R-822 were the best enzyme producers, with amylolytic enzymatic activities higher than 2.0.

KEYWORDS: Extracellular amylases, solid medium, pH, temperature

¹ Universidade Federal do Amazonas, E-mail: arlem@inpa.gov.br

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, E-mail: nathaliaflo@gmail.com

³ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Bolsista do CNPq e professor da UEA, E-mail: luizoli@inpa.gov.br

Entre os microrganismos fixadores de nitrogênio, as bactérias conhecidas como rizóbio constituem o grupo melhor estudado. Excetuando-se o complexo nitrogenase, que catalisa a conversão do N_2 à NH_3 , pouco se sabe sobre o perfil enzimático dessas bactérias (Oliveira 2006). Oliveira *et al.* (2006a), ao estudarem em meios solidificados, a capacidade de 67 isolados de rizóbio nativos da região em produzir enzimas hidrolíticas, reportaram a atividade amilolítica como sendo a mais freqüente, ocorrendo em 1/3 das bactérias.

Entre os fatores de natureza físico-química, o pH e a temperatura podem influenciar tanto no número como na atividade enzimática dos microrganismos (Sudharhsan *et al.* 2007). Investigando os microrganismos envolvidos nas transformações dos compostos de carbono e nitrogênio do solo, Sanomiya e Nahas (2003) verificaram que a freqüência de bactérias amilolíticas foi significativamente afetada pelo pH do solo. Em meio solidificado, a produção de amilase por isolados de *Colletotrichum* também obedeceu a um padrão dependente do pH ambiental (Maccheroni Jr. *et al.* 2004). Trabalhando com rizóbios, Oliveira *et al.* (2006b) concluíram que a atividade amilolítica de alguns isolados estão sujeitas às variações de pH do meio sólido, com as maiores atividades ocorrendo em pH 6,5. Apesar da importância da temperatura na produção de enzimas microbianas (Rahman *et al.* 2005), dados sobre o efeito dessa variável na atividade enzimática de rizóbios em meio sólido são raros, ou mesmo inexistentes na literatura. O presente estudo objetivou avaliar semiquantitativamente, em meio sólido, a influência de diferentes pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios nativos da Amazônia Central.

Os sete isolados usados nesse estudo foram obtidos da Coleção de Rizóbios do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA. Essas bactérias foram previamente isoladas de solos de várzea (INPA R-632, R-732, R-822 e R-922) e terra firme (INPA R-110, R-222 e R-231) da região. Até a execução dos ensaios enzimáticos, as bactérias foram mantidas em meio YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent 1970) a 4 °C.

Para testar a capacidade dos rizóbios em produzir amilases, colônias puras dos isolados foram repicadas no centro de placas de Petri contendo meio YMA modificado (Oliveira *et al.* 2006a,b). Os isolados foram incubados por 96 h em estufa de crescimento bacteriológico. Ao final desse período, adicionaram-se às placas 5 mL de tintura de iodo (2%) adquirido em farmácia. Uma zona amarelada ao redor das colônias, em contraste com o meio azulado, indicou atividade amilolítica das bactérias (Buzzini e Martini 2002). A atividade enzimática foi determinada por meio da relação entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia, expressa como índice enzimático (Hankin e Anagnostakis 1975).

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 7 x 3 x 3, constituído por sete isolados de rizóbio (INPA R-922, R-822, R-732, R-632, R-231, R-222 e R-110), três valores de pH (5,0, 6,5 e 8,0) e três temperaturas (25, 35 e 42 °C), com três repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. Os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{x} + 0,05$ e submetidos à análise de variância e as médias significativas discriminadas pelo teste de Tukey ($P < 0,01$), com auxílio do programa ESTAT 2.0.

Houve variação significativa entre os três fatores estudados, bem como entre eles para a atividade amilolítica das bactérias (Tabelas 1 e 2). Esses dados corroboram a importância do pH e da temperatura na síntese e secreção de amilases microbianas (Sudharhsan *et al.* 2007). Analisando individualmente os fatores, foi observado que os isolados INPA R-110 e R-822 exibiram os maiores índices amilolíticos (Tabela 1). Quanto ao fator pH, os maiores índices enzimáticos foram anotados em ambientes ácidos, com a maior média em pH 5,0 (Tabela 1). Oliveira *et al.* (2006b) também anotaram maiores índices em condições ácidas, porém, com as maiores freqüências e atividades em pH 6,5. Esse fato pode estar relacionado, em parte, às condições ácidas dos solos da Amazônia, conforme anteriormente discutido por Oliveira *et al.* (2006b). Quanto à temperatura, as maiores atividades foram registradas a 25 e 35 °C (Tabela 1). Segundo Rahman *et al.* (2005), ao provocar alterações nas propriedades físicas da membrana celular, a temperatura afeta, também, a síntese de enzimas extracelulares. De uma forma geral, esses resultados sugerem a natureza mesofílica das amilases produzidas pelos isolados.

De acordo com os desdobramentos para as médias de pH dentro de isolados, as bactérias INPA R-110, R-822 e R-222 exibiram as maiores atividades amilolíticas em pH 5,0 (Tabela 1). Em pH 6,5 e 8,0, INPA R-632 e INPA R-732 exibiram, respectivamente, as maiores atividades. Para as médias de temperatura, o R-110 exibiu máxima atividade em 25 °C. Por outro lado, a temperatura de incubação não causou variação significativa no índice enzimático do R-822 e R-222 (Tabela 1). Quanto aos isolados INPA R-732 e R-632, os maiores índices foram registrados nas temperaturas de 25 e 35 °C. Nas condições estudadas, o INPA R-922 e R-231 mostraram as menores atividades enzimáticas (Tabela 1).

Alguns autores (Stamford *et al.* 1998; Oliveira *et al.* 2006b) recomendam um índice enzimático $\geq 2,0$ para considerar um microrganismo como produtor potencial de enzimas em meio sólido. Excetuando os isolados INPA 922 e R-231, que exibiram índices amilolíticos inferiores a 2,0 (Tabela 1), os demais podem ser considerados, dependendo do pH bons produtores de amilases.

Os desdobramentos para as médias dos isolados dentro dos fatores pH e temperatura mostraram o INPA R-110 como maior produtor de amilase em pH 5,0. Em pH 6,5,

Tabela 1 – Médias gerais e desdobramentos das interações isolados x pH e isolados x temperatura para a atividade amilolítica das bactérias estudadas. Médias de três repetições. Dados transformados em $\sqrt{x + 0,05}$.

| Isolados | pH | | | Médias |
|------------|---------|---------|----------|--------|
| | 5,0 | 6,5 | 8,0 | |
| INPA R-922 | 0,0 b F | 0,4 a D | 0,4 a D | 0,3 C |
| INPA R-822 | 3,0 a B | 2,3 b A | 2,0 c AB | 2,4 A |
| INPA R-732 | 1,6 b D | 1,8 b B | 2,1 a A | 1,8 B |
| INPA R-632 | 1,5 c D | 2,3 a A | 1,8 b BC | 1,8 B |
| INPA R-231 | 0,4 a E | 0,5 a D | 0,0 b E | 0,3 C |
| INPA R-222 | 2,2 a C | 1,5 b C | 1,6 b C | 1,8 B |
| INPA R-110 | 3,3 a A | 2,2 b A | 1,9 c AB | 2,4 A |
| Médias | 1,7 a | 1,6 b | 1,4 c | - |

| Isolados | Temperatura (°C) | | | Médias |
|-------------|------------------|---------|---------|--------|
| | 25 | 35 | 42 | |
| INPA R- 922 | 0,0 b E | 0,4 a D | 0,4 a D | 0,3 C |
| INPA R-822 | 2,4 a B | 2,5 a A | 2,3 a A | 2,4 A |
| INPA R-732 | 2,0 a C | 2,0 a B | 1,5 b C | 1,8 B |
| INPA R-632 | 1,9 a C | 2,0 a B | 1,6 b C | 1,8 B |
| INPA R-231 | 0,9 a D | 0,0 b E | 0,0 b E | 0,3C |
| INPA R-222 | 1,8 a C | 1,8 a C | 1,9 a B | 1,8 B |
| INPA R-110 | 2,7 a A | 2,2 b B | 2,4 b A | 2,4 A |
| Médias | 1,7 a | 1,6 b | 1,4 c | - |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas (médias gerais de pH e temperatura, DMS = 0,08 e interações isolados dentro de pH e temperatura, DMS = 0,21) e maiúsculas nas colunas (Médias gerais de isolados, DMS = 0,15 e das interações pH e temperatura dentro de isolados, DMS = 0,26) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,01).

essa bactéria também exibiu alta atividade, mas sem diferir significativamente da observada para o INPA R-822 e R-632. Em pH 8,0, a maior atividade de amilase foi exibida pelo INPA R-732, porém sem diferir da registrada para os isolados R-822 e R-110. (Tabela 1). O R-822 apresentou os maiores índices enzimáticos em 35 e 42 °C, mas sem diferir do observado para o R-110 em 42 °C. Esses resultados sugerem a possibilidade de uso dessas enzimas nos vários campos biotecnológicos, sobretudo na indústria do amido (van der Maarel *et al.* 2002).

Ao analisar a influência das condições de pH dentro de cada temperatura (Tabela 2), nota-se que em ambientes ácidos, os isolados produziram as maiores quantidades de enzima, quando incubados nas temperaturas de 25 e 35 °C. Em meio alcalino, as bactérias mostraram máxima atividade enzimática em 42 °C, mas sem diferir da observada em pH 6,5. Os desdobramentos para as médias de temperatura dentro de pH (Tabela 2) revelaram que em 25 °C, ocorreu a maior produção de amilase em pH 5,0. Contrariamente, na temperatura de 42 °C, essa produção enzimática foi significativamente reduzida. Em fermentação submersa, condições ótimas de pH (6,0-9,0) e temperatura (35-80 °C) são reportadas para a produção de amilases por bactérias (Burhan *et al.* 2003; Sudharhsan *et al.* 2007). Os dados do presente estudo se enquadram nesses resultados, embora obtidos de experimentos em meio sólido.

Tabela 2 - Desdobramentos da interação pH x temperatura para a atividade amilolítica dos isolados estudados.

| pH | Temperatura (°C) | | |
|-----|------------------|---------|---------|
| | 25 | 35 | 42 |
| 5,0 | 2,5 a A | 1,7 b A | 1,0 c B |
| 6,5 | 1,3 b B | 1,6 a A | 1,7 a A |
| 8,0 | 1,2 b B | 1,4 b B | 1,7 a A |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas (médias de pH dentro de temperatura, DMS = 0,13) e maiúsculas nas colunas (médias da temperatura dentro de pH do meio, DMS = 0,14) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,01).

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado do Amazonas (FAPEAM, Processo N° 1437/2006) pela concessão de recursos financeiros para a realização desse estudo. Luiz Antonio de Oliveira é bolsista do CNPq.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Burhan, A.; Nisa, U.; Gokhan, C.; Omer, C.; Ashabil, A.; Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem.*, 38:1397-1403.
- Buzzini, P.; Martini, A. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J. Appl. Microbiol.*, 93:1.020-1.025.

- Hankin, L.; Anagnostakis, S.L. 1975. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, 67:597-607.
- Lealem, F.; Gashe, B.A. 1994. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef. (*Eraglostis tef.*). *J. Appl. Bacteriol.*, 77:348-352.
- Maccheroni Jr., W.; Araújo, W.L.; Azevedo, J.L. 2004. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. *Sci. agric.*, 61:298-302.
- Oliveira, A.N. 2006. Characterization of amylase and protease produced by indigenous central Amazonian rhizobia strains. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 150pp (in portuguese).
- Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A.; Andrade, J.S.; Chagas Júnior, A.F. 2006a. Extracellular hydrolytic enzymes in indigenous strains of rhizobia in Central Amazonia, Amazonas, Brazil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26:853-860 (in Portuguese, with abstract in English).
- Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A.; Andrade, J.S.; Chagas Júnior, A.F. 2006b. Enzymatic activity of native Central Amazonian rhizobia strains grown in different levels of acidity. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26:204-210 (Portuguese, with abstract in English).
- Rahman, R.N.Z.A.; Geok, L.P.; Basri, M.; Salleh, A.B. 2005. Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K, *Bioresour Technol.*, 96:429-436.
- Sanomiya, L.T.; Nahas, E. 2003. Hydrolases producers microorganisms involved in the soil carbon and nitrogen cycling. *Ci. Rural*, 33:835-842 (Portuguese, with abstract in English).
- Stamford, T.L.M.; Araújo, J.M.; Stamford, N.P. 1998. Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 18:382-385 (Portuguese, with abstract in English).
- Sudharhsan, S.; Senthilkumar, S.; Ranjith, K. 2007. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. *Afr. J. Biotechnol.*, 6:430-435.
- van der Maarel, M.J.E.C.; van der Veen, B.; Uitdehaag, J.C.M.; Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J. Biotechnol.*, 94:137-155.
- Vincent, J.M. 1970. *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 140pp.

Recebido em 08/05/2008

Aceito em 04/01/2010