

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por  
actinomicetos isolados de solo**

Produção de metabólitos secundários por actinomicetos de solo

Mariana Wanderley Duarte<sup>1\*</sup>, Raquel Garibaldi Damasceno<sup>2</sup>, Sabrina Pinto Salamoni<sup>1</sup>,  
Margaroni Fialho de Oliveira<sup>1</sup> e Sueli Teresinha Van Der Sand (Or.)<sup>1</sup>

Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas na forma de Artigo Científico, a ser  
submetido para a Revista Brasileira de Biociências.

Porto Alegre, novembro de 2009

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmento Leite, 500. CEP: 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 7712. Agronomia. CEP: 91540-000. Porto Alegre, RS, Brasil.

\*Autor para contato. E-mail: [marischuldiner@gmail.com](mailto:marischuldiner@gmail.com)

## RESUMO

Actinomicetos são bactérias Gram positivas filamentosas, habitantes saprofíticos do solo. Produzem uma grande variedade de compostos bioativos, como antibióticos e enzimas, o que tem propiciado intensas pesquisas visando às potenciais aplicações destes produtos. Este trabalho tem como objetivos identificar actinomicetos isolados de solo e avaliar o potencial destes em produzir enzimas hidrolíticas sob diferentes temperaturas de crescimento, bem como compostos antimicrobianos. Foram empregados 38 actinomicetos, 31 isolados de solo sob cultura de acácia-negra e sete de solo sob formação secundária de Mata Atlântica. A identificação foi baseada nas características morfológicas, analisadas através da técnica do microcultivo. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando os substratos específicos para cada enzima: amido, caseína, carboximetilcelulose, gelatina, óleo de oliva e pectina, como única fonte de carbono. Dos actinomicetos isolados, 84,2% foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Nos ensaios de atividade enzimática foi verificado que a temperatura de incubação dos isolados interferiu na capacidade de produção das enzimas e que esta variação foi específica para cada atividade enzimática. A expressão da caseinase aumentou com o aumento da temperatura. Com exceção da lipase e gelatinase, as enzimas apresentaram atividade em todas as temperaturas de incubação testadas. Nos testes de atividade antimicrobiana, mais de 80% dos isolados inibiram o crescimento dos fitopatógenos *Xanthomonas axonopodis* e *X. campestris*. Dentre as bactérias de interesse clínico as mais sensíveis foram as Gram positivas. Um resultado significativo foi que 52,6% dos actinomicetos inibiram o crescimento de uma cepa *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, isolada de ambiente hospitalar.

**Palavras-chave:** *Streptomyces*; enzimas hidrolíticas; antimicrobianos; patógenos.

## ABSTRACT

### **Antimicrobial activities and extracellular enzyme production by soil actinomycetes**

Actinomycetes are saprophytic filamentous Gram-positive bacteria widely distributed in the soil. They produce several bioactive compounds, such as antibiotics and enzymes, leading to intense researches regarding possible applications for these products. This study aims to identify actinomycetes isolated from soil, and to evaluate their potential to produce antimicrobial compounds and hydrolytic enzymes under different growth temperatures. Among the 38 actinomycetes isolated, 31 were from soil cultures of black wattle and seven from Atlantic Forest soil. The identification focused on morphological characteristics, obtained through microculture technique analysis. During enzyme activity tests specific substrates for each enzyme were used as a sole carbon source: starch, casein, carboxymethyl cellulose, gelatin, olive oil and pectin. The identification results pointed that 84,2% of the isolated actinomycetes belong to the *Streptomyces* genus. Enzyme activity tests revealed that incubation temperature of the isolated actinomycetes does matter in enzyme activity and the variation was specific for each enzyme. Casein activity increased at higher temperatures. Except for lipase and gelatinase, all other enzymes were active regardless of the incubation temperature. Antimicrobial activity tests revealed that more than 80% of the isolated actinomycetes inhibited the growth of *Xanthomonas axonopodis* and *X. campestris* phytopathogens. Among clinically important bacteria, Gram-positive were the most sensible to antimicrobial compounds. Final results also showed that 52,6% of the actinomycetes inhibited the growth of a *Staphylococcus aureus* strain, which is resistant to methicillin and commonly isolated in clinical environments.

**Key-words:** *Streptomyces*; hydrolytic enzymes; antimicrobial agents; pathogens.

## INTRODUÇÃO

O solo é um sistema altamente complexo, caracterizado por uma variedade de processos químicos, físicos e biológicos. Microrganismos de solo, juntamente com enzimas extracelulares e a meso e macrofauna do solo, conduzem todas as reações metabólicas conhecidas neste ambiente. Os microrganismos desempenham um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica do solo e na ciclagem de nutrientes. (Alef & Nannipieri 1995).

Os actinomicetos apresentam uma grande diversidade metabólica e são capazes de utilizar várias fontes de carbono e energia (McCarthy & Willians 1992, Holmalahti *et al.* 1994). São um grupo heterogêneo de bactérias Gram positivas que apresentam no seu genoma altas concentrações de guanina e citosina, crescem com um aspecto filamentosos e ramificado, sendo na sua maioria aeróbias e com crescimento relativamente lento (Aghamirian & Ghiasian 2009, McCarthy & Willians 1992). Sua diversidade morfológica está baseada primeiramente nas estratégias reprodutivas, que levam à formação de uma variedade de estruturas de esporos (Ensign 1978). Podem ser encontrados em diversos ambientes naturais, como a água, plantas em decomposição, nódulos de raízes de plantas, sedimentos, fezes de animais, lodo ativado e produtos alimentícios, mas são encontrados principalmente no solo (McCarthy & Willians 1992). Kennedy (1999) afirmou que 30% da população total de microrganismos no solo corresponde aos actinomicetos. Conforme Iwai & Takahashi (1992), 80% dos actinomicetos de solo ocorrem na camada mais superficial (0-10 cm), diminuindo progressivamente com a profundidade. Geralmente, atividades enzimáticas decrescem com a profundidade do solo (Deng & Tabatabai 1996, Ekenler & Tabatabai 2003), assim como a biomassa microbiana e a quantidade de carbono orgânico disponível.

As enzimas presentes no solo são, predominantemente, de origem microbiana (Insam 2001), sendo que as enzimas extracelulares de interesse estão envolvidas na degradação de paredes celulares de microrganismos e plantas, geração de húmus e a mineralização de nitrogênio e fósforo presentes em compostos orgânicos (Allison 2007). Os actinomicetos possuem um papel importante na degradação da matéria orgânica devido à sua atividade proteolítica e enzimas que atuam na decomposição de queratinas, quitinas, celuloses e amidos (McCarthy & Willians 1992, Holmalahti *et al.* 1994).

As enzimas com maior importância industrial utilizadas atualmente incluem proteases, enzimas que hidrolisam carboidratos e enzimas lipolíticas. As aplicações mais comuns dessas enzimas são o processamento de alimentos, produção de bebidas, nutrição animal, couro, papel, polpa, têxtil, detergentes, entre outras. Os microrganismos são a mais importante fonte de produção enzimática (Dastager *et al.* 2009). Os *Streptomyces* destacam-se entre os actinomicetos pela capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas com aplicação industrial (Padilha 1998).

Amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido em diversos produtos e progressivamente em polímeros menores, compostos de unidades de glicose (Dastager *et al.* 2009). O polímero de amido, assim como outros polímeros, requer a combinação de enzimas para a sua completa hidrólise, incluindo  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases e isoamilases (Poonam & Dalel 1995). A hidrólise do amido compreende 30% do consumo de enzimas no mundo (Van Der Maarel *et al.* 2002).

A celulose, um polissacarídeo com ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, fornece uma fonte de carbono significativa para a comunidade microbiana do solo (Berg & Laskowski 2006). A atividade da celulase se refere a um sistema enzimático que consiste de três tipos de celulases: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases. As celulases são amplamente

utilizadas na indústria têxtil, e contam com aproximadamente 14% do mercado de enzimas industriais. (Miettinen-Oinonen 2007).

Atividades proteolíticas, detectadas em microrganismos, plantas e animais, catalisam a hidrólise de proteínas a polipeptídeos e de oligopeptídeos a aminoácidos. Devido ao alto peso molecular das proteínas, o primeiro passo enzimático da degradação protéica ocorre extracelularmente (Alef & Nannipieri 1995). Para a avaliação da atividade de proteases nos solos, podem ser utilizados diversos tipos de substratos, como a caseína, azocaseína, gelatina, peptídeos e albuminas (Ladd & Buttler 1972, Ross *et al.* 1975). As proteases contam com cerca de 60% do mercado enzimático total, e estão entre as mais valiosas enzimas comerciais (Dastager *et al.* 2008). A principal aplicação de proteases na indústria leiteira é para a fabricação de queijo (Demain & Adrio 2008).

Uma proporção significativa de lipídios entra no solo sob a forma de triacilgliceróis, que é a forma de armazenamento primária de lipídios em tecidos de plantas e animais. Portanto, o passo inicial de degradação envolve a enzima lipase (triacilglicerol acilhidrolase), com a liberação de ácidos graxos e glicerol (Alef & Nannipieri 1995). As lipases aceleram a degradação de resíduos gordurosos (Masse *et al.* 2001), além de apresentarem uma crescente importância na biorremediação (Hasan *et al.* 2006).

Enzimas pectinolíticas são conhecidas por desempenharem um papel fundamental na maceração de tecidos de plantas pela degradação da pectina localizada na lamela média e na parede celular primária de plantas superiores (Collmer & Keen 1986, Kotoujanky 1987). Os actinomicetos desempenham um importante papel na degradação de resíduos de plantas (Piret & Demain 1988). A biodegradação da pectina, um polissacarídeo constituído principalmente por ligações  $\alpha$ -1,4 de ácido D-galacturônico e seus metilésteres, ocorre como resultado da ação de diferentes enzimas extracelulares (Osborne & Dehority 1989, Voragen *et al.* 1980).

Os actinomicetos são capazes de produzir diversos metabólitos secundários, muitos dos quais apresentam propriedades antifúngicas e antibacterianas (Kumari *et al.* 2006). São responsáveis por mais de 2/3 da produção total de antibióticos e membros do gênero *Streptomyces* contam com 70-80% da produção de metabólitos secundários, com contribuições menores dos gêneros *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* e *Actinoplanes* (Challis & Hopwood 2003).

Cepas do gênero *Streptomyces*, quando testadas *in vitro*, têm apresentado potencial para a produção de antibióticos que reduzem ou inibem o desenvolvimento de patógenos de plantas (Kim *et al.* 2000, Ouhdouch *et al.* 2001, Bressan 2003). O controle biológico de patógenos de plantas tem se mostrado uma alternativa potencial como estratégia para o manejo de doenças (Bressan & Figueiredo 2008). Tais agentes, além do potencial para proteger as sementes, colonizam a rizosfera e podem proteger as porções subterrâneas das plantas em crescimento do ataque de patógenos (Ahmad & Baker 1987).

Devido ao uso excessivo de antibióticos, tem aumentado o número de microrganismos resistentes (Banga *et al.* 2008). Por mais de duas décadas tem-se isolado de hospitais cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que são resistentes a muitos antibióticos (Ceylan *et al.* 2008). Portanto, a busca contínua por novos metabólitos ativos contra diferentes microrganismos patogênicos se faz necessária.

O principal objetivo do presente trabalho foi identificar actinomicetos isolados de solo em nível de gênero, avaliar a produção de enzimas hidrolíticas sob diferentes temperaturas de incubação e avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados frente a diferentes patógenos de interesse clínico e agrícola.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta**

A coleta do solo foi realizada por Damasceno (2008). As amostras foram coletadas na camada de 0-10cm do perfil de solo sob cultivo de acácia-negra com três anos de idade e sob formação secundária de Mata Atlântica, de uma área rural do município de São Sebastião do Caí, Rio Grande do Sul.

### **Isolamento**

As amostras foram processadas misturando-se 10g de solo em 90mL de água peptonada. Com a solução obtida foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-3}$ . Para o isolamento dos actinomicetos, alíquotas de 100 $\mu$ L de todas as diluições foram semeadas em placas de Petri, pelo método de semeadura em superfície, contendo o meio de cultura ágar Amido Caseína - ACA (amido 1%, caseína 0,03%, KNO<sub>3</sub> 0,2%, NaCl 0,2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2%, MgSO<sub>4</sub> 0,005%, FeSO<sub>4</sub> 0,001% e ágar 1,5%). As placas foram incubadas na temperatura de 37°C por 15 dias para o crescimento dos actinomicetos e após o crescimento, colônias foram selecionadas aleatoriamente. O isolamento e cultivo dos actinomicetos foram realizados em meio ACA (Fig. 1). Foram isolados 38 actinomicetos, dos quais 31 foram provenientes do solo sob cultura de acácia-negra com três anos de idade e sete do solo sob formação secundária de Mata Atlântica. Os isolados foram mantidos em meio ACA inclinado à temperatura de 4°C.

### **Recuperação dos isolados de actinomicetos**

Os isolados foram recuperados em caldo amido caseína e incubados por dez dias a 37°C. As culturas foram esgotadas em placas contendo meio ACA para confirmação da

pureza das colônias (Fig. 2). Uma vez confirmada a pureza pela observação da colônia e coloração de Gram, as amostras foram repicada em tubos contendo ACA inclinado.

### Identificação dos actinomicetos

Os actinomicetos foram identificados pela observação morfológica, através da técnica do microcultivo (Fig. 3) conforme descrito por Williams *et al.* (1989). Essa técnica possibilita a observação do micélio aéreo e das estruturas reprodutivas, quando presentes, e do micélio sobre o substrato.



Fonte: Raquel Garibaldi Damasceno.



Fonte: Raquel Garibaldi Damasceno.

**Figura 1.** Isolamento dos actinomicetos em meio ACA. O isolado com pigmentação laranja pertence ao gênero *Micromonospora*, e os demais são do gênero *Streptomyces*.

**Figura 2.** Esgotamento de *Streptomyces* sp. em meio ACA.



Fonte: A autora.

**Figura 3.** Técnica do microcultivo.

## **Avaliação da atividade enzimática**

O potencial enzimático dos actinomicetos foi avaliado para a produção das seguintes enzimas extracelulares: amilase, caseinase, celulase, gelatinase, lipase e pectinase. Todos os meios de cultura foram inoculados em picada e as placas incubadas nas temperaturas de 25, 30 e 37 e 45°C, e os tempos de incubação variaram entre cinco e 21 dias, conforme o substrato.

A degradação do amido foi avaliada no meio ágar amido (1% de amido, 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de carne, 0,05% de NaCl e 1,5% de ágar). A hidrólise do amido foi observada após sete dias de incubação, através da adição de lugol (1% de iodo e 2% de iodeto de potássio). O amido reage com o iodo e fica com uma coloração escura, o que possibilita a observação de halos transparentes ao redor dos microrganismos positivos (Fig. 4).

A atividade celulolítica dos isolados foi avaliada utilizando-se o meio de Tuncer (0,5% de carboximetilcelulose, 0,6% de extrato de levedura, 0,01% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,03% de NaCl, 0,01%  $\text{MgSO}_4$ , 0,002% de  $\text{CaCO}_3$  e 1,5% ágar e 0,001% solução traço: 0,1% de  $\text{FeSO}_4$ , 0,09% de  $\text{ZnSO}_4$  e 0,02% de  $\text{MnSO}_4$ ). Após cinco dias de incubação, foi adicionado o corante vermelho congo 0,5% por 30 minutos, e as placas foram lavadas três vezes com NaCl 1M. O vermelho congo tem afinidade com a celulose, e o NaCl retira o corante das regiões em que o substrato não foi hidrolisado (Fig. 5).

A atividade proteolítica foi avaliada com a utilização dos substratos caseína e gelatina. A degradação da caseína foi observada em um meio contendo 10g de leite em pó desnatado diluídos em 90mL de água destilada, e 3g de ágar em 97mL. Após esterilização em autoclave, as duas soluções foram misturadas e distribuídas nas placas de Petri. Após 14 dias de incubação, a formação de uma zona clara ao redor da colônia indicou resultado positivo (Fig. 6). A degradação da gelatina foi avaliada em meio de cultura contendo 12% de gelatina, 0,5% de peptona e 0,3% de extrato de carne. A presença da enzima gelatinase foi observada após

20 dias de incubação. Nos tubos em que o meio de cultura ficou líquido após ter sido incubado a temperatura de geladeira por 24h, o actinomiceto foi classificado como positivo para a enzima (Fig. 7).

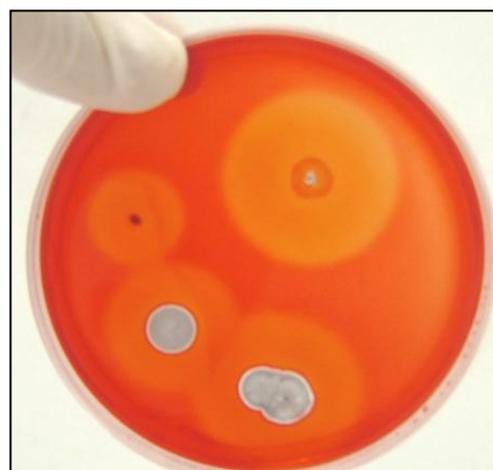
A atividade lipolítica foi observada após o crescimento dos isolados em meio de cultura contendo 0,5% de peptona, 0,1% de extrato de levedura, 0,4% de NaCl, 1% de ágar, 2,5% óleo de oliva e solução de rodamina B 0,001%. O óleo de oliva foi esterilizado por filtração em um sistema de membrana de 0,22 $\mu$ m. A hidrólise do óleo de oliva foi observada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 350nm, após cinco, sete, 14 e 21 dias de incubação. Foram observados halos de cor laranja ao redor dos actinomicetos que apresentam a enzima, devido à presença de rodamina B no meio de cultura, que emite fluorescência laranja na presença de ácidos graxos (Fig. 8).

A degradação da pectina foi avaliada em meio TSA (ágar tripticaseína de soja) com 1% de pectina cítrica. Para a avaliação da atividade pectinolítica, uma solução de lugol foi adicionada sobre as placas de Petri incubadas por sete dias, para verificar a formação de halo transparente ao redor da colônia (Fig. 9).



Fonte: A autora.

**Figura 4.** Hidrólise do amido. Os cinco isolados são positivos para a enzima amilase.



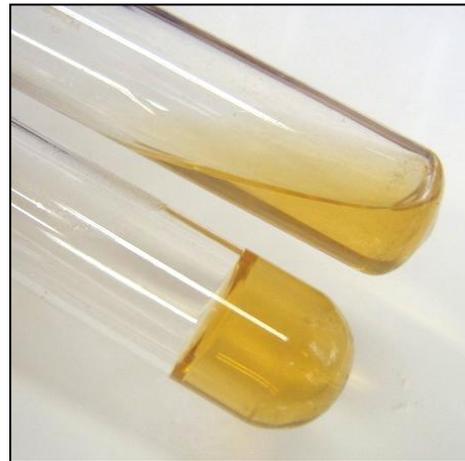
Fonte: A autora.

**Figura 5.** Hidrólise da carboximetilcelulose. Os quatro isolados são positivos para celulase.



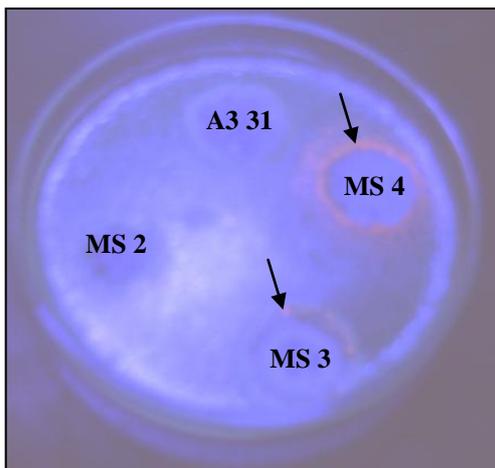
Fonte: A autora.

**Figura 6.** Hidrólise da caseína. Os isolados A3 12 e A3 13 são positivos para a caseinase.



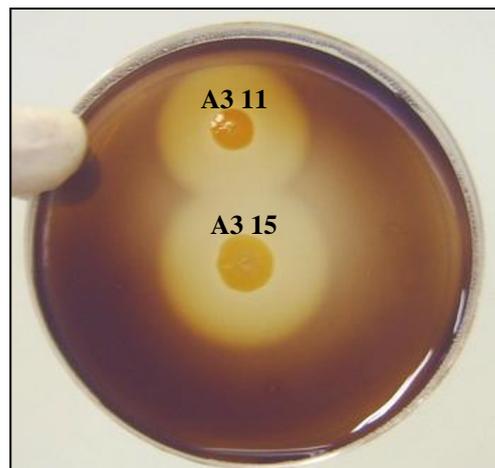
Fonte: A autora.

**Figura 7.** Hidrólise da gelatina. O tubo de cima apresenta resultado positivo.



Fonte: A autora.

**Figura 8.** Hidrólise do óleo de oliva. Os isolados positivos para lipase estão marcados com flechas.



Fonte: A autora.

**Figura 9.** Hidrólise da pectina. Os dois isolados são positivos para pectinase.

### Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica da dupla camada. Os actinomicetos foram inoculados com agulha de platina, em picada, sobre placas de Petri contendo meio de cultura ACA e incubados por dez a 14 dias em temperatura de 30°C. Após o crescimento, 1mL de uma suspensão em caldo tripticaseína de soja (TSB) de bactérias-alvo

com aproximadamente  $10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC) por mL (conforme a diluição 0,5 na escala de MacFarland) foi inoculada em 9mL de ágar Mueller-Hinton fundido, e este vertido sobre as culturas nas placas. As placas foram incubadas por 24h na temperatura ótima para cada microrganismo (30°C para bactérias fitopatogênicas e 37°C para bactérias de importância clínica), e a presença de compostos antimicrobianos foi verificada pela observação de halos transparentes ao redor dos actinomicetos, indicando ausência de crescimento bacteriano. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Foram testadas 11 bactérias, sendo que cinco são Gram positivas e seis são Gram negativas (Tab. 1). As bactérias fitopatogênicas foram cedidas pelo Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia (UFRGS), e as demais bactérias são de importância clínica e pertencem à coleção do laboratório de bacteriologia.

**Tabela 1.** Bactérias testadas na avaliação da atividade antimicrobiana

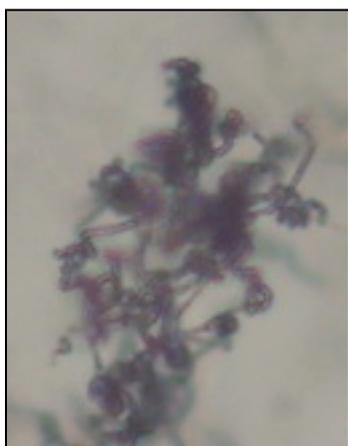
Bactérias Gram positivas	Bactérias Gram negativas
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Enterococcus faecium</i> **	<i>Pectobacterium brasiliensis</i> *
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15422
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Ralstonia solanacearum</i> *
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 33591	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> *
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> *

ATCC - American Type Culture Collection; \*Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia (UFRGS);

\*\*Laboratório de Microbiologia Ambiental, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (UFRGS).

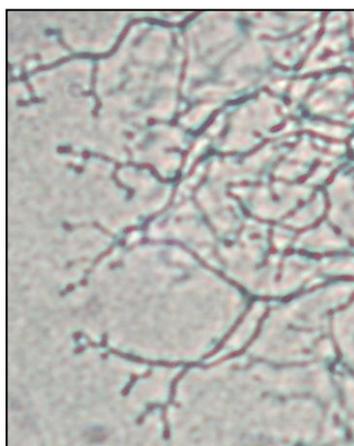
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação através das observações das características morfológicas dos actinomicetos, pela técnica do microcultivo, possibilitou a classificação em nível de gênero. Ocorreu o predomínio do gênero *Streptomyces* (Fig. 10), com 84,2% (n=32) dos isolados. Os demais foram identificados como *Micromonospora* (Fig. 11), com 7,9% (n=3), *Nocardia* (Fig. 12) (2,6%) (n=1) e *Terrabacter* (Fig. 13) (2,6%) (n=1) e um isolado não foi possível identificar baseando-se nas características morfológicas das estruturas. Segundo Basilio *et al.* (2003) os gêneros de actinomicetos mais comumente isolados, principalmente de solo, são *Streptomyces* e *Micromonospora*.



Fonte: A autora.

**Figura 10.** *Streptomyces* sp. em aumento de 400x.



Fonte: A autora.

**Figura 11.** *Micromonospora* sp. em aumento de 400x.



Fonte: A autora.

**Figura 12.** *Nocardia* sp. em aumento de 400x.



Fonte: A autora.

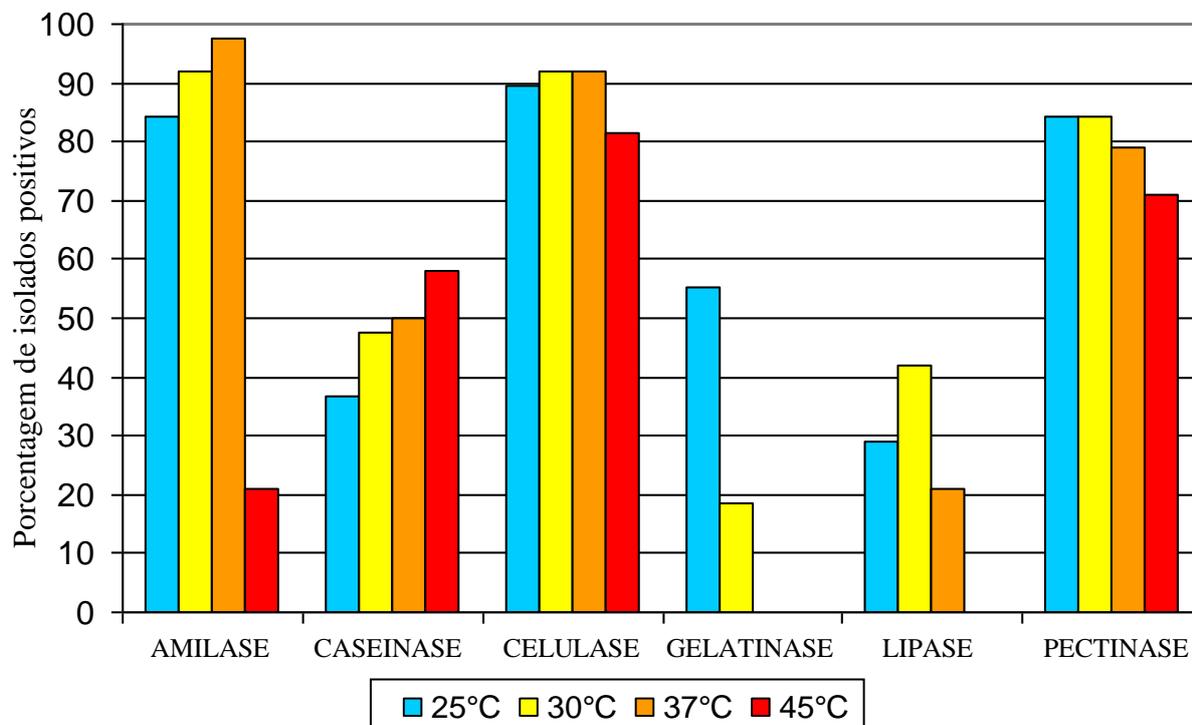
**Figura 13.** *Terrabacter* sp. em aumento de 400x.

No solo sob cultura de acácia-negra 96,8% (n=30) dos isolados pertencem ao gênero *Streptomyces*, e somente um isolado foi classificado como *Micromonospora* (3,2%). No solo sob Mata Atlântica ocorreram os gêneros *Streptomyces* (28,6%, n=2), *Micromonospora* (28,6%, n=2), *Nocardia* (14,3%, n=1), e *Terrabacter* (14,3%, n=1). Os valores de pH de ambos os solos foram determinados no estudo de Damasceno *et al.* (2008), e corresponderam a pH 5,8 no solo sob acácia-negra, e pH 6,0 no solo sob Mata Atlântica. De acordo com Suzuki *et al.* (1994), o gênero *Streptomyces* tem ampla distribuição em solos com valores de pH entre 5,0 e 8,5.

Suzuki *et al.* (1994), no estudo da distribuição de actinomicetos em vários tipos de solo do Japão (região de Kanto e região subtropical), afirmaram que na região de Kanto os estreptomicetos representaram mais de 50% do total de actinomicetos de todos os solos avaliados. No solo sob campo, o percentual de estreptomicetos foi de 80%. Na região subtropical, os estreptomicetos predominaram em todos os tipos de solo com valores médios de 52 a 68% do total de actinomicetos. O gênero *Micromonospora* ficou em segundo lugar no solo sob floresta subtropical (22%), e nocardioformes representaram 10 a 14% do total em todas as amostras de solo. Conforme Xu *et al.* (1996), o gênero *Streptomyces* no solo provavelmente desempenha as funções ecológicas mais importantes, representando mais de 90% do total dos actinomicetos.

Deve-se levar em consideração que a prevalência do gênero *Streptomyces* nas amostras de solo avaliadas talvez tenha se devido aos procedimentos de cultivo utilizados. Os meios de cultura, temperatura e tempo de incubação podem ter favorecido o crescimento desses microrganismos, subestimando a real diversidade presente nesses ambientes.

Nos ensaios de atividade enzimática, foi avaliado o percentual de isolados capazes de hidrolisar os diferentes substratos testados. Esses isolados foram comparados nas quatro temperaturas testadas para o crescimento (25, 30, 37 e 45°C), para cada enzima (Fig. 14).



**Figura 14.** Porcentagem de isolados positivos para as enzimas extracelulares nas temperaturas de 25, 30, 37 e 45°C.

Foi verificado que a temperatura de incubação dos isolados interferiu na capacidade de produção das enzimas e que esta variação foi específica para cada atividade enzimática. Com exceção da lipase e gelatinase, as enzimas apresentaram atividade em todas as temperaturas de incubação testadas.

Segundo Gomes *et al.* (2007), existe uma estreita relação entre o nicho ocupado por um microrganismo e as características de suas enzimas intra e extracelulares. Deve-se então levar em consideração que os actinomicetos isolados de solo são mesófilos, cuja temperatura de crescimento varia de 10 a 50°C, apresentando a temperatura ótima entre 25 e 40°C.

O percentual de isolados positivos para a enzima amilase aumentou à medida que a temperatura de incubação aumentou de 25 a 37°C, no entanto diminuiu consideravelmente à temperatura de 45°C. Segundo Sivaramakrishnan *et al.* (2006), a influência da temperatura na produção de amilase está relacionada com o crescimento do organismo. Então, a temperatura ótima vai depender se o microrganismo é mesofílico ou termofílico. A maior parte dos estudos de produção de amilase com fungos mesofílicos tem sido feita em temperaturas que variam de 25 a 37°C (Ramachandran *et al.* 2004, Francis *et al.* 2003). A produção de amilase em nível ótimo tem sido relatada entre 50-55°C para culturas de fungos termofílicos (Jensen & Olsen 1992, Bunni *et al.* 1989). Amilases bacterianas são produzidas numa faixa muito mais ampla de temperatura. *Bacillus* spp. produzem  $\alpha$ -amilase em temperaturas que variam de 37 a 60°C (Syu & Chen 1997, Mielenz 1983). Segundo alguns autores, microrganismos hipertermófilos produziram  $\alpha$ -amilase a 80°C, e um psicrófilo da Antártica obteve produção máxima de  $\alpha$ -amilase a 4°C (Vieille & Zeikus 2001, Feller *et al.* 1998).

A atividade celulolítica aumentou levemente na temperatura de 25 para 30°C, não diferiu de 30 para 37°C e diminuiu a 45°C. Al-Tai *et al.* (1989) relataram bom crescimento de uma espécie de *Streptomyces* a 28, 37 e 48°C, em diferentes concentrações de CMC. Pankratov & Dedysh (2009) confirmaram que estreptomicetos psicrotróficos isolados de turfeira são capazes de degradar a celulose em baixas temperaturas (5, 15 e 25°C). A temperatura ótima para hidrólise da celulose foi 25°C, e a hidrólise diminuiu com a diminuição da temperatura.

A atividade das proteases diferiu conforme o substrato utilizado. A expressão da caseinase aumentou conforme o aumento da temperatura, portanto mais isolados foram positivos para caseinase a 45°C. Além do aumento do número de isolados, pôde-se observar um aumento no tamanho dos halos de degradação. Dastager *et al.* (2008) avaliaram a atividade proteolítica de uma espécie de *Streptomyces* em meio contendo caseína. A enzima

apresentou atividade numa faixa de temperatura de 27 a 55°C, com atividade ótima a 45°C. A hidrólise da gelatina foi maior a 25°C, e nenhum isolado foi capaz de hidrolisar a gelatina a 37 nem 45°C.

A atividade lipolítica foi maior a 30°C, e nenhum isolado degradou o óleo de oliva a 45°C. A faixa de temperatura ótima para produção de lipase por microrganismos mesófilos é ampla, geralmente entre 30 e 60°C (Lotti & Alberghina 2007).

A hidrólise da pectina não diferiu de 25° para 30°C, e diminuiu com o aumento da temperatura. De acordo com Gummadi *et al.* (2007), em geral, a temperatura ótima para atividade de pectato liases é na faixa de 30 a 40°C. Entretanto, certas pectato liases de microrganismos termófilos apresentam temperatura ótima entre 50 e 75°C. A temperatura ótima da maioria das pectinesterases varia entre 40 e 60°C. Phutela *et al.* (2005) descreveram a produção de pectinases com atividade máxima a 60°C pelo fungo termotolerante *Aspergillus fumigatus*.

Espera-se que microrganismos termófilos produzam enzimas extracelulares capazes de tolerar uma temperatura correspondente a, no mínimo, aquela ótima para seu crescimento, ou seja, acima de 45°C (Gomes *et al.* 2007). De acordo com Hang & Woodams (1993), um fato interessante é que, mesmo entre os fungos mesófilos, que crescem entre 28 e 32°C, é possível encontrar enzimas que atuam em temperaturas até 30°C acima da temperatura máxima de crescimento do microrganismo produtor.

Todos os isolados apresentaram atividade para pelo menos uma das enzimas testadas, nas quatro diferentes temperaturas de incubação, com exceção de sete isolados que não são capazes de crescer na temperatura de 45°C: quatro pertencentes ao gênero *Streptomyces*, uma *Nocardia*, um *Terrabacter* e o isolado não identificado.

O isolado A3 3 (Tab. 2 e 3), pertencente ao gênero *Streptomyces*, foi positivo para todas as enzimas testadas nas temperaturas de 25, 30 e 37°C (exceto para gelatinase, que não

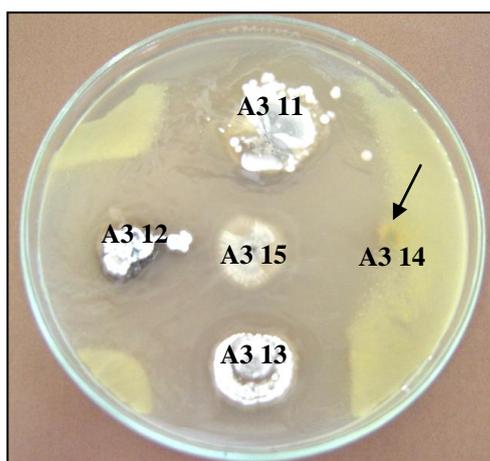
foi expressa a 37°C). Na temperatura de 45°C, cinco isolados do gênero *Streptomyces* foram positivos para amilase, caseinase, celulase e pectinase. A gelatinase e a lipase não foram expressas a 45°C.

Rodrigues (2006) observou que o gênero *Streptomyces* apresentou o maior número de isolados com atividade enzimática, e apenas nos meios com gelatina, pectina e óleo de oliva houve um menor número de isolados com as enzimas correspondentes.

Devido à capacidade de degradar diversos substratos, esses isolados apresentam potencial biotecnológico e podem ser alvos de futuros estudos.

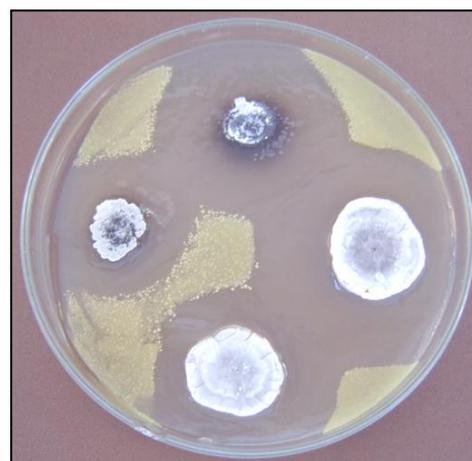
A atividade antimicrobiana foi testada com bactérias fitopatogênicas e de importância clínica.

Dentre as fitopatogênicas, *Xanthomonas axonopodis* foi inibida por 89,5% dos actinomicetos e *X. campestris* por 84,2% (Fig. 15 e 16). Nenhum dos isolados foi capaz de produzir um composto capaz de inibir *Pectobacterium brasiliensis* e *Ralstonia solanacearum* (Tab. 3).



Fonte: A autora.

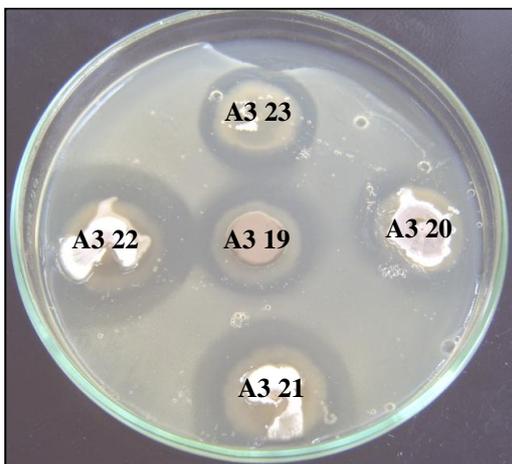
**Figura 15.** Inibição de *Xanthomonas axonopodis*. O isolado marcado com uma flecha não apresentou atividade antimicrobiana.



Fonte: A autora.

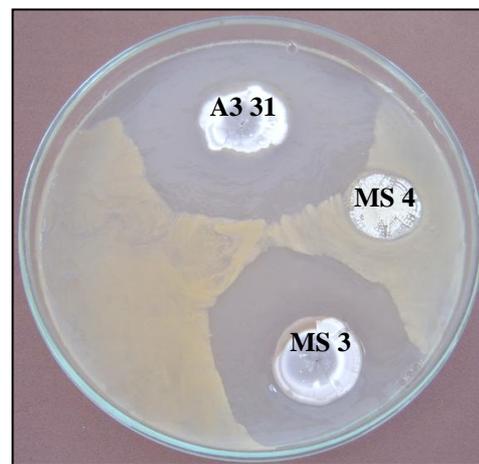
**Figura 16.** Inibição de *Xanthomonas campestris*. Os quatro isolados apresentaram atividade antimicrobiana.

Das bactérias de interesse clínico, as mais sensíveis foram as Gram positivas (Tab. 2), principalmente *Listeria innocua*, inibida por 73,7% dos isolados (Fig. 17), e *Staphylococcus aureus*, por 73,3% (Fig. 18). O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi inibido por 52,6% dos isolados (Fig. 19). Dentre as Gram negativas, poucos isolados foram capazes de inibir *Escherichia coli* (10,5%) (Fig. 20), e nenhum isolado apresentou atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (Tab. 3).



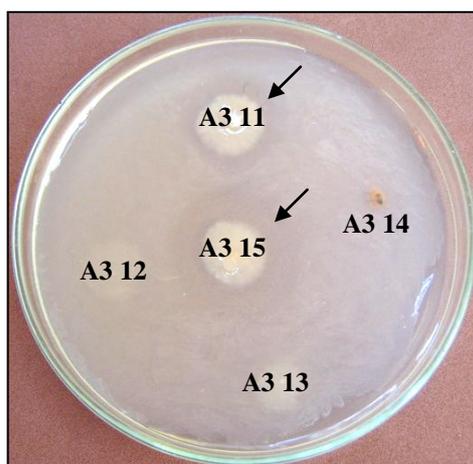
Fonte: A autora.

**Figura 17.** Inibição de *Listeria Innocua* pelos cinco isolados.



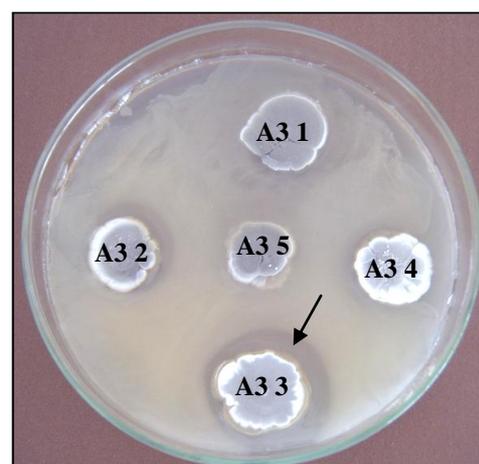
Fonte: A autora.

**Figura 18.** Inibição de *Staphylococcus aureus* por dois isolados.



Fonte: A autora.

**Figura 19.** Inibição de *Staphylococcus aureus* MRSA por dois isolados (flechas).



Fonte: A autora.

**Figura 20.** Inibição de *Escherichia coli* por um isolado (flecha).

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana de actinomicetos de solo contra bactérias Gram positivas.

<b>Isolados</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA
A3 1 - S	+	-	+	+	-
A3 2 - S	+	+	+	+	+
A3 3 - S	+	+	+	+	+
A3 4 - S	+	+	+	+	+
A3 5 - S	-	+	+	+	-
A3 6 - S	+	+	+	+	+
A3 7 - S	+	+	+	+	+
A3 8 - S	+	+	+	+	+
A3 9 - S	-	-	-	-	-
A3 10 - S	-	-	-	-	-
A3 11 - S	-	+	+	+	+
A3 12 - S	+	-	-	-	-
A3 13 - S	-	-	-	-	-
A3 14 - M	-	-	-	-	-
A3 15 - S	+	+	+	+	+
A3 16 - S	-	+	+	+	+
A3 17 - S	-	+	+	+	+
A3 18 - S	-	-	+	+	-
A3 19 - S	+	-	+	+	-
A3 20 - S	+	-	+	+	-
A3 21 - S	+	+	+	+	-
A3 22 - S	+	+	+	+	+
A3 23 - S	+	-	+	+	+
A3 24 - S	+	+	+	+	+
A3 25 - S	+	+	+	+	+

A3 26 - S	+	-	+	+	+
A3 27 - S	+	+	+	+	+
A3 28 - S	+	+	+	+	+
A3 29 - S	-	-	+	+	-
A3 30 - S	-	+	+	+	+
A3 31 - S	+	+	+	+	+
MS 2 - S	-	-	+	-	-
MS 3 - S	+	+	+	+	+
MS 4 - N	-	-	-	-	-
MS 5 - NI	-	-	-	+	-
MS 6 - M	-	-	-	-	-
MS 7 - T	-	-	-	+	-
MS 8 - M	-	-	-	-	-
Percentual de	55,3%	52,6%	73,7%	73,3%	52,6%

#### Isolados Positivos

Em destaque, os isolados positivos para todas as bactérias testadas. A3 = Isolados de acácia-negra com 3 anos de idade; MS = Isolados de mata secundária; S = *Streptomyces*; M = *Micromonospora*; N = *Nocardia*; NI = não-identificado; T = *Terrabacter*; (+) = atividade antimicrobiana positiva; (-) = atividade negativa.

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana de actinomicetos de solo contra bactérias Gram negativas.

Isolados	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pectobacterium brasiliensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
A3 1 - S	-	-	-	-	+	+
A3 2 - S	-	-	-	-	+	+
A3 3 - S	+	-	-	-	+	+
A3 4 - S	-	-	-	-	+	+
A3 5 - S	-	-	-	-	+	+
A3 6 - S	-	-	-	-	+	+

<b>A3 7 - S</b>	+	-	-	-	+	+
<b>A3 8 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 9 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 10 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 11 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 12 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 13 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 14 - M</b>	-	-	-	-	-	-
<b>A3 15 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 16 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 17 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 18 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 19 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 20 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 21 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 22 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 23 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 24 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 25 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 26 - S</b>	+	-	-	-	+	+
<b>A3 27 - S</b>	+	-	-	-	+	+
<b>A3 28 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 29 - S</b>	-	-	-	-	+	-
<b>A3 30 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>A3 31 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>MS 2 - S</b>	-	-	-	-	-	-
<b>MS 3 - S</b>	-	-	-	-	+	+
<b>MS 4 - N</b>	-	-	-	-	-	+
<b>MS 5 - NI</b>	-	-	-	-	+	+
<b>MS 6 - M</b>	-	-	-	-	-	-

<b>MS 7 - T</b>	-	-	-	-	+	-
<b>MS 8 - M</b>	-	-	-	-	+	-
<b>Percentual de Isolados Positivos</b>	10,5%	0%	0%	0%	89,5%	84,2%

Em destaque, os isolados positivos para 3 bactérias testadas. A3 = Isolados de acácia-negra com 3 anos de idade; MS = Isolados de mata secundária; S = *Streptomyces*; M = *Micromonospora*; N = *Nocardia*; NI = não-identificado; T = *Terrabacter*; (+) = atividade antimicrobiana positiva; (-) = atividade negativa.

Verificou-se que 14 isolados, todos do gênero *Streptomyces*, inibiram todas as bactérias Gram positivas testadas. Outros autores também verificaram uma alta taxa de inibição de bactérias Gram positivas por *Streptomyces* e por outros gêneros de actinomicetos produtores de substâncias bioativas (Basilio *et al.* 2003, Rodrigues 2006). Nenhum isolado foi capaz de inibir todas as Gram negativas. Quatro isolados do gênero *Streptomyces* inibiram três bactérias Gram negativas, entre elas *Escherichia coli*. A baixa atividade contra bactérias Gram negativas pode estar associada à estrutura complexa da membrana externa (Rodrigues 2006).

Somente dois isolados, ambos do gênero *Micromonospora*, não apresentaram atividade antimicrobiana contra nenhuma das bactérias testadas.

Os antimicrobianos produzidos pelos actinomicetos contra o isolado de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é um resultado significativo. As cepas de MRSA rapidamente se disseminam em ambientes hospitalares, limitando a antibioticoterapia de combate às estafilococcias por *S. aureus* aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina (Santos *et al.* 2007). Portanto, os isolados capazes de inibir a cepa de MRSA podem ser estudados futuramente, visando à descoberta de novos e mais eficientes antibióticos.

## CONCLUSÃO

Os actinomicetos do gênero *Streptomyces* foram predominantes nas amostras de solo analisadas. Todos os isolados hidrolisam pelo menos um dos substratos testados, evidenciando a produção de uma grande quantidade de metabólitos. Mais de 80% dos isolados inibiram *Xanthomonas* sp., e dentre as bactérias de importância clínica, as mais sensíveis foram as Gram positivas. Os isolados que inibiram o maior número de bactérias podem ser alvos de futuros estudos visando à caracterização dos compostos com atividade antimicrobiana.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Sueli Van Der Sand, a todos os colegas dos laboratórios 164 e 209, à minha família, em especial meus pais, minha irmã e meu namorado Luiz, e às minhas colegas e amigas Bianca, Dalila, Janaína e Letícia. Muito obrigada a todos.

## REFERÊNCIAS

- AGHAMIRIAN, M. R. & GHIASIAN, S. A. 2009. Isolation and characterization of medically important aerobic actinomycetes in soil of Iran (2006 - 2007). *The Open Microbiology Journal*, 3: 53-57.
- AHMAD, J. S. & BAKER, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77: 182-189.

ALEF, K. & NANNIPIERI, P. (Eds.) 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Londres: Academic Press. 576 p.

ALLISON, S. D., GARTNER, T. B., HOLLAND, K., WEINTRAUB, M. & SINSABAUGH, R. L. 2007. Soil enzymes: linking proteomics and ecological process. In: HURST, C. J., CRAWFORD, R. L., GARLAND, J. L., LIPSON, D. A., MILLS, A. L. & STETZENBACH, L. D. (Eds.) *Manual of Environmental Microbiology*. Cleveland: ASM Press.

AL-TAI, A. M., ABDUL-NOUR, B. A. & ABDUL-RAZZAK, S. H. 1989. Cellulase production from actinomycetes isolated from Iraqui soils: Characterization of a cellulolytic *Streptomyces* sp. Strain AT7. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 2: 109-112.

BANGA, J., PRAVEEN, V., SINGH, V., TRIPATHI, C. K. M. & BIHARI, V. 2008. Studies on medium optimization for the production of antifungal and antibacterial antibiotics from a bioactive soil actinomycete. *Med. Chem. Res.*, 17: 425-436.

BASILIO, A., GONZÁLEZ, I., VICENTE, M. F., GORROCHATEGUI, J., CABELLO, A., GONZÁLEZ, A. & GENILLOUD, O. 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 814-823.

BERG, B. & LASKOWSKY, R. 2006. Litter decomposition: a guide to carbon and nutrient turnover. *Advances in Ecological Research*, 38: 1-428.

BRESSAN, W. 2003. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. *Biocontrol*, 48: 233-240.

BRESSAN, W. & FIGUEIREDO, J. E. F. 2008. Efficacy and dose-response relationship in biocontrol of *Fusarium* disease in maize by *Streptomyces* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 311-316.

- BUNNI, L., MC HALE, L. & MC HALE, A. P. 1989. Production, isolation and partial characterization of an amylase system produced by *Talaromyces emersonii* CBS 814.70. *Enzyme and Microbial Technology*, 11: 370-375.
- CEYLAN, O., OKMEN, G. & UGUR, A. 2008. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *EurAsian Journal of BioSciences*, 2: 73-82.
- CHALLIS, G. L. & HOPWOOD, D. A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *PNAS*, 100: 14555-14561.
- COLLMER, A. & KEEN, N. T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 383-409.
- DAMASCENO, R. G., DUARTE, M. W., SALAMONI, S. P., OLIVEIRA, M. F. & VAN DER SAND, S. T. 2008. *Propriedades químicas e microbiológicas de solo sob cultivo de acácia-negra (Acacia mearnsii De Wild) e formação secundária de Mata Atlântica*. 23 f. Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- DASTAGER, S. G., AGASAR, D. & PANDEY, A. 2009. Production and partial purification of  $\alpha$ -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39: 189-194.
- DASTAGER, S. G., DAYANAND, A., LI, W., KIM, C., LEE, J., PARK, D., TIAN, X. & RAZIUDDIN, Q. S. 2008. Proteolytic activity from a alkali-thermotolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. *Current Microbiology*, 57: 638-642.

- DEMAIN, A. L. & ADRIO, J. L. 2008. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*, 38: 41-55.
- DENG, S. P. & TABATABAI, M. A. 1996. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. I. Amidohydrolases. *Biol. Fertil. Soils*, 22: 202-207.
- EKENLER, M. & TABATABAI, M. A. 2003. Tillage and residue management effects on  $\beta$ -glucosaminidase activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 871-874.
- ENSIGN, J. C. 1978. Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Annual Review of Microbiology*, 32: 185-219.
- FELLER, G., LE BUSSY, O. & GERDAY, C. 1998. Expression of psychrophilic genes in mesophilic hosts: assessment of the folding state of a recombinant  $\alpha$ -amylase. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1163-1165.
- FRANCIS, F., SABU, A., NAMPOOTHIRI, K. M., RAMACHANDRAN, S., GHOSH, S., SZAKACS, G. & PANDEY, A. 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 15: 107-115.
- GOMES, E., GUEZ, M. A. U., MARTIN, N. & SILVA, R. 2007. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, 30: 136-145.
- GUMMADI, S. N., MANOJ, N. & KUMAR, S. 2007. Structural and biochemical properties of pectinases. In: POLAINA, J. & MACCABE, A. P. (Eds.) *Industrial Enzymes*. Springer. 99-115.
- HANG, Y. D. & WOODAMS, E. E. 1993. Characterization of glucoamylase from *Neosartorya fischeri*. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, 26: 483-484.

- HASAN, F., SHAH, A. A. & HAMEED, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235-251.
- HOLMALAHTI, J., VON WRIGHT, A. & RAATIKAINEN, A. O. 1994. Variations in the spectra of biological activities of actinomycetes isolated from different soils. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 144-146.
- INSAM, H. 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma*, 100: 389-402.
- IWAI, Y. & TAKAHASHI, Y. 1992. Selection of microbial sources of bioactive compounds. In: OMURA, S. (Ed.) *The search for bioactive compounds from microorganisms*. Nova York: Spring-Verlag. 281-302.
- JENSEN, B. & OLSEN, J. 1992. Physicochemical properties of a purified alpha amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 112-116.
- KENNEDY, A. C. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 65-76.
- KIM, B. S., MOON, S. & HWANG, B. K. 2000. Structure elucidation and fungal activity of an anthracycline antibiotic, daunomycin, isolated from *Actinomadura roseola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1875-1881.
- KOTOUJANKY, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by softrot erwinias. *Annual Review of Phytopathology*, 25: 405-430.

- KUMARI, K. K., PONMURUGAN, P. & KANNAN, N. 2006. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. from soil samples for secondary metabolite production. *Biotechnology*, 5: 478-480.
- LADD, J. N. & BUTLER, J. H. A. 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4: 19-30.
- LOTTI, M. & ALBERGHINA, L. 2007. Lipases: molecular structure and function. In: POLAINA, J. & MACCABE, A. P. (Eds.) *Industrial Enzymes*. Springer. 263-281.
- MASSE, L., KENNEDY, K. J. & CHOU, S. P. 2001. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 76: 629-635.
- MC CARTHY, A. J. & WILLIAMS, S. T. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. *Gene*, 115: 189-192.
- MIELENZ, J. R. 1983. *Bacillus stearothermophilus* contains a plasmid-borne gene for  $\alpha$ -amylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80: 5975-5979.
- MIETTINEN-OINONEN, A. 2007. Cellulases in the textile industry. *Industrial Enzymes*: 51-63. Springer.
- OSBORNE, J. M. & DEHORITY, B. A. 1989. Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2247-2250.

OUHDOUCH, Y., BARAKATE, M. & FINANCE, C. 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *European Journal Soil Biology*, 37: 69-74.

PADILHA, G. 1998. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: Embrapa CNPMA. 327-343.

PANKRATOV, T. A. & DEDYSH, S. N. 2009. Cellulolytic streptomycetes from *Sphagnum* peat bogs and factors controlling their activity. *Microbiology*, 78: 227-233.

PIRET, M. J. & DEMAÏN, A. L. 1988. Actinomycetes in biotechnology. In: GOODFELLOW, M., WILLIMAS, S. T. & MORDARSKI, M. (Ed.) *Actinomycetes in biotechnology*. Londres: Academic Press.

POONAM, N. & DALEL, S. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 770-778.

PHUTELA, U., DHUNA, V., SANDHU, S. & CHADHA, B. S. 2005. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 63-69.

RAMACHANDRAN, S., PATEL, A. K., NAMPOOTHIRI, K. M., FRANCIS, F., NAGY, V., SZAKACS, G. & PANDEY, A. 2004. Coconut oil cake – A potential raw material for the production of  $\alpha$ -amylase. *Bioresource Technology*, 93: 169-174.

RODRIGUES, K. 2006. *Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos*. 119 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

- ROSS, D. J., SPEIR, T. W., GILTRAP, D. J., MCNEILLY, B. A. & MOLLY, L. F. 1975. A principal component analysis of some biochemical activities in climosequence of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 7: 349-355.
- SANTOS, A. L., SANTOS, D. O., FREITAS, C. C., FERREIRA, B. L. A., AFONSO, I. F., RODRIGUES, C. R. & CASTRO, H. C. 2007. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43: 413-423.
- SIVARAMAKRISHNAN, S., GANGADHARAN, D., NAMPOOTHIRI, K. M., SOCCOL, C. R. & PANDEY, A. 2006.  $\alpha$ -Amylases from microbial sources – an overview on recent developments. *Food Technol. Biotechnol.*, 44: 173-184.
- SUZUKI, K., NAGAI, K., SHIMIZU, Y. & SUZUKI, Y. 1994. Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, 8: 122-127.
- SYU, M. J. & CHEN, Y. H. 1997. A study on the  $\alpha$ -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chemical Engineering Journal*, 65: 237-247.
- 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. *Journal of Biotechnology*, 94: 137-155.
- VIEILLE, K. & ZEIKUS, G. J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms of thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65: 1-43.
- VORAGEN, F. G. J., HEUTINK, R. & PILNIK, W. 1980. Solubilization of apple cell walls with polysaccharide degrading enzymes. *Journal of Applied Biochemistry*, 2: 452-468.

WILLIAMS, S. T., GOODFELLOW, M. & ALDERSON, G. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman & Henrici 1943. In: WILLIAMS, S. T., SHARPE M. E. & HOLT, J. G. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 2452-2492.

XU, L., LI, Q. & JIANG, C. 1996. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 244-248.