

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**IDENTIFICAÇÃO, PRODUÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E COMPLEXOS
ENZIMÁTICOS DE ISOLADOS DE ACTINOMICETOS**

Katiane Rodrigues
Bióloga – Urcamp

Porto Alegre
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**IDENTIFICAÇÃO, PRODUÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E COMPLEXOS
ENZIMÁTICOS DE ISOLADOS DE ACTINOMICETOS**

Katiane Rodrigues
Bióloga – Urcamp

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Orientador: Sueli Van Der Sand

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Abril, 2006

AGRADECIMENTOS

À prof^a Dra. Sueli Van Der Sand pela orientação, paciência, apoio e amizade: essenciais durante estes dois anos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente em especial à prof^a Dra. Gertrudes Corção.

As colegas de curso e amigas Ana Maris Carlesso, Cristina Bergman Zaffari, Juliana Flach, Rosane Müller, Silvia Pavan, Sylvia Verdin, pelo apoio, amizade e pelos momentos de descontração que fizeram estes dois anos inesquecíveis.

As alunas de iniciação científica Dariane Castro Pereira, Maria Karolina E. F. Feijó e Vânia Jofre Barragana pela amizade, companheirismo e colaboração.

As colegas de laboratório Margaroni Oliveira e Sabrina Salamoni pela convivência, amizade e força.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia em especial Sayonara Peixoto Rosa.

À minha família em especial aos meus pais pelo apoio, amor e carinho que sempre me fizeram seguir em frente.

Ao meu noivo Julian Passamani Pinto, pelo amor, pelas palavras de estímulo, pela paciência e compreensão.

Aos meus sogros, principalmente a minha sogra Tânia Passamani Pinto pelo estímulo desde o começo do curso.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho o meu muito obrigada.

À Capes pelo apoio financeiro.

IDENTIFICAÇÃO, PRODUÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E COMPLEXOS ENZIMÁTICOS ISOLADOS DE ACTINOMICETOS

Autor: Katiane Rodrigues¹
Orientadora: Dra. Sueli Van Der Sand

RESUMO

A compostagem é um processo biológico natural de degradação da matéria orgânica realizado espontaneamente no ambiente pelos microrganismos. Entre estes microrganismos os actinomicetos são bactérias Gram-positivas com grandes concentrações de G+C em seu DNA. Os actinomicetos são responsáveis pela decomposição de resíduos complexos em leira de compostagem. Eles são bastante conhecidos devido a sua capacidade de produzir inúmeros compostos bioquimicamente ativos como: antibióticos, vitaminas e enzimas. O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar actinomicetos de processo de compostagem e avaliar a sua capacidade de sintetizar enzimas extracelulares e metabólitos ativos contra bactérias e leveduras patogênicas. Foram realizadas 10 coletas em uma leira de compostagem composta de resíduos domésticos. Os isolados foram identificados através de microbiologia clássica utilizando análise morfológica das estruturas reprodutivas e provas bioquímicas. A atividade enzimática foi avaliada utilizando amido, carboximetilcelulose, tween 80, caseína, pectina, óleo de oliva e gelatina como substrato. Foram isolados 195 actinomicetos com predomínio dos gêneros *Streptomyces sp.* (66,1%) e *Nocardia sp.* (25,1%). Na avaliação da atividade bioativa contra bactérias e leveduras patogênicas 47,1% dos isolados produziram substâncias inibitórias, destes 31,1% dos isolados inibiram mais de um microrganismo patogênico. As bactérias Gram-positivas mostraram-se mais sensíveis aos metabólitos produzidos pelos actinomicetos. O gênero *Streptomyces* foi o que apresentou o maior número de isolados produtores de metabólitos bioativos. Dentre os substratos avaliados o amido foi hidrolisado por 98% dos isolados e a pectina 26%, caracterizando um perfil enzimático heterogêneo deste grupo de microrganismos. *Streptomyces* foi o gênero que apresentou a melhor atividade com todos os substratos avaliados.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. (119p.) Abril, 2006.

IDENTIFICATION, PRODUCTION BIOACTIVE METABOLITES AND COMPLEX ENZYMATIC ISOLATED OF ACTINOMYCETES

Author: Katiane Rodrigues¹

Adviser: Dra. Sueli Van Der Sand

ABSTRACT

Composting is a natural process biological developed by microorganisms that decomposition complex organic residues. Among these microorganisms are the actinomycetes are Gram positive bacteria with a high concentration of C+G in it's genome. Actinomycetes are responsible for the decomposition of complex residues in the composting pile. They are very well known by their capacity to produce many biochemically active compounds like antibiotics, vitamins and enzymes. The aim of this work was to isolate and identify actinomycetes form a composting process and to assess their capacity to synthesize extracelular enzymes and secondary metabolites active against pathogenic bacteria and yeasts. Ten samples were collected during all the process and actinomycetes were isolated. The isolates were identified using morphologic description of the reproductive structures followed by biochemical tests. Enzymic activity was assessed using starch, carboximethylcellulose, tween80, casein, pectin, olive oil, and gelatin as substrates. From the composting pile 195 actinomycetes isolates were isolated and identified . The prevailing genera were *Streptomyces* sp. (66,1%) and *Nocardia* sp.(25,1%). Evaluating the production of bioactive metabolites 47,6% of the isolates produced some inhibitory substance against pathogenic microorganisms and out of this 31,1% of the isolates inhibited more then one microorganism. More generally de Gram positive bacterias were more sensitive to the action of the metabolites. The genus *Streptomyces* was the most common isolate to produce bioactive metabolites. Among the substrates starch was hidolyze by 98% of the isolates and pectin by 26% showing a very heterogen pattern. *Streptomyces* was the genus that present the best activity with all the substrates used.

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. RS, Brazil. (119p.) April, 2006.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	01
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Compostagem	03
2.2. Actinomicetos	06
2.3. Actinomicetos em processo de compostagem	09
2.4. Identificação e classificação dos actinomicetos	10
2.5. Metabólito secundário	14
2.5.1. Antibióticos	16
2.5.2. Actinomicetos produtores de substâncias bioativas	16
2.6. Actinomicetos produtores de enzimas com potencial biotecnológico	18
2.6.1. Amilases	18
2.6.2. Celulases	19
2.6.3. Esterases	21
2.6.4. Lipases	22
2.6.5. Pectinases	24
2.6.6. Proteases	26
3.MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Coleta das amostras	27
3.2. Isolamento dos actinomicetos	28
3.3. Recuperação da amostra congelada	28
3.4. Coloração de Gram	29
3.5. Identificação morfológica	29
3.6. Identificação bioquímica	30
3.6.1. Crescimento sobre uma única fonte de carbono	30
3.6.2. Crescimento sobre uma única fonte de nitrogênio	31
3.6.3. Determinação da deoxiribonuclease (DNAse)	32
3.6.4. Degradação da esculina	33
3.6.5. Produção de gás sulfídrico	33
3.6.6. Crescimento em diferentes concentrações de NaCl	33
3.6.7. Redução de nitrato	33
3.6.8. Degradação da tirosina	34
3.6.9. Degradação da uréia	34
3.6.10. Degradação da xantina	34
3.6.11. Pigmentação	35

3.6.11.1. Cor da massa de esporos	35
3.6.11.2. Cor do micélio sobre o substrato	35
3.6.11.3. Produção de melanina	35
3.7. Atividade enzimática	36
3.7.1. Degradação do amido	36
3.7.2. Avaliação da atividade celulolítica (carboximetilcelulose)	36
3.7.3. Avaliação da esterase	37
3.7.4. Degradação da gelatina	37
3.7.5. Atividade lipolítica	37
3.7.6. Atividade pectinolítica	38
3.7.7. Atividade da caseinase	38
3.8. Atividade antimicrobiana dos isolados	38
3.8.1. Microrganismos testados para atividade biocida	39
4. RESULTADOS	41
4.1 Isolamento e identificação morfológica dos actinomicetos	42
4.2. Identificação bioquímica dos actinomicetos	
4.3. Avaliação da atividade biocida dos isolados do processo de compostagem	68
4.4. Avaliação da atividade enzimática dos actinomicetos	76
5. DISCUSSÃO	79
5.1. Identificação bioquímica dos isolados	79
5.2. Atividade antimicrobiana	84
5.3. Atividade enzimática	89
5.3.1. Amilase	89
5.3.2. Proteases	90
5.3.3. Celulases	92
5.3.4. Esterases e Lipases	93
5.3.5. Pectinases	94
6. CONCLUSÕES	95
7. PERSPECTIVAS	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
9. APÊNDICES	98
9.1.Meios de cultura utilizados para o isolamento e identificação dos actinomicetos	113
9.1.1. Agar amido caseína	113
9.1.2 . Meio base para a utilização de fontes de carbono	113
9.1.3. Meio base para a utilização de fontes de nitrogênio	114
9.1.4. Meio para a degradação do amido	115
9.1.4.1. Meio para a degradação do amido em pH 10	115
9.1.5. Meio para a degradação da caseína	115
9.1.6. Agar esculina	115
9.1.7. Agar gelatina	115

9.1.8. Meio para a produção de gás sulfídrico	116
9.1.8.1. Caldo nutriente	116
9.1.9. Caldo NaCl 7,10,13%	116
9.1.10. Caldo Nitrato	116
9.1.11. Meio basal para a degradação da tirosina	116
9.1.12. Meio basal para a degradação da xantina	116
9.1.13. Agar glicerol asparagina	117
9.1.14. Agar Sais Minerais	117
9.1.15. Agar Tirosina	117
9.1.16. Meio de Tuncer (atividade para a carboximetilcelulose)	118
9.1.17. Meio para a atividade lipolítica	118
9.1.18. Meio para a atividade da esterase	119
9.1.19. Agar Sabouraud	119

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1	Microrganismos patogênicos testados na avaliação da atividade antimicrobiana dos actinomicetos	40
TABELA 2	Características bioquímicas baseado na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentração de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro	48
TABELA 3	Características bioquímicas baseadas na utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro	58
TABELA 4	Distribuição dos isolados identificados nos diferentes grupos de actinomicetos segundo Williams et al. (1983a)	67
TABELA 5	Distribuição dos gêneros produtores de compostos biocidas testados contra bactérias e leveduras de importância clínica	73
TABELA 6	Distribuição da atividade antimicrobiana dos grupos de actinomicetos, representados em números absolutos contra bactérias Gram-positivas	74
TABELA 7	Distribuição da atividade antimicrobiana dos grupos de actinomicetos, representados em números absolutos contra bactérias Gram-negativas	75
TABELA 8	Porcentagem dos diferentes gêneros de actinomicetos que apresentaram atividade enzimática utilizando diferentes substratos	77
TABELA 9	Perfil enzimático dos grupos de actinomicetos identificados e mais os gêneros <i>Terrabacter</i> e <i>Nocardiosis</i> representados em números percentuais	78

RELAÇÃO DE FIGURAS

- FIGURA 1 Áreas de inibição produzidas por isolado pertencente ao gênero *Streptomyces* contra *Yersinia enterocolítica* 68
- FIGURA 2 Halo de inibição demonstrando a atividade biocida de um isolado do grupo 225 contra (a) *Staphylococcus aureus*, (b) *Streptococcus pyogenes* e (c) *Bacillus cereus* 71
- FIGURA 3 Isolado do grupo H com atividade biocida contra (d) *Criptococcus neoformans*, (e) *Candida albicans* e (f) *Spreptococcus pyogenes* 72

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μ = velocidade específica de crescimento
 α = alfa
 β = beta
 \pm = mais ou menos
(-) = negativo
(+) = positivo
 μL = microlitro
ATCC = American Type Culture Collection
cm = centímetro
DNA = ácido desoxirribonucléico
DNAse = enzima que digere o ácido desoxirribonucléico
g/L = grama por litro
h = horas
HCl = ácido clorídrico
g/mL = grama por mililitro
Kg = quilograma
M = molar
min = minuto
mL = mililitro
mm = milímetro
NaCl = cloreto de sódio
 n° = número
N = normalidade
nm = nanômetro
pH = potencial hidrogeniônico
 $^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius
r.p.m. = rotações por minuto
sp. = espécie
spp. = espécies
TSA = ágar triptona de soja
TSB = caldo triptona de soja
UFC = unidades formadoras de colônia
UFC/g = unidades formadoras de colônia por grama
UV = ultravioleta
(x) = vezes

1. INTRODUÇÃO

A crescente produção de resíduos nas grandes cidades devido às atividades industriais, comerciais e agrícolas, causam sérios problemas ambientais. A produção exagerada desses resíduos, bem como o tratamento inadequado dos mesmos vem contaminando o solo, o ar e a água. Em virtude dos crescentes desastres ecológicos, existe uma constante preocupação com o tratamento dos resíduos produzidos.

As estratégias de manejo dos resíduos como o reaproveitamento e reciclagem reduzem a quantidade de resíduos sólidos gerados, aumentando a ciclagem e recuperação dos mesmos. Técnicas alternativas para o tratamento dos resíduos, como a compostagem, proporcionam um destino final útil aos compostos orgânicos.

A compostagem é um processo natural, aeróbio, desenvolvido por uma população diversificada de microrganismos, os quais decompõem a matéria orgânica em nutrientes simples. Na agricultura, o composto orgânico proporciona o desenvolvimento das plantas, ampliando a capacidade das mesmas de absorver água e nutrientes do solo, aumentam a capacidade do

solo em reter água, proporcionando uma melhor conservação do solo e da água e melhoram a disponibilidade de nutrientes os quais podem ser usados como corretivos da acidez.

Dentre os inúmeros grupos microbianos que participam do processo de compostagem, os actinomicetos são bactérias Gram-positivas predominantemente filamentosas que em leiras de compostagem desempenham importantes funções degradando compostos de difícil decomposição, como a lignocelulose, lignina, celulose, entre outros materiais recalcitrantes.

Estes microrganismos, especialmente o gênero *Streptomyces* possuem a capacidade de sintetizar muitos metabólitos secundários ativos diferentes biologicamente, como antibióticos, herbicidas, pesticidas, antiparasíticos, além de enzimas como amilases, celulasas, lipases, xilanases. Destes compostos os antibióticos se destacam devido à sua importância comercial e terapêutica.

Portanto o objetivo desse trabalho foi identificar os grupos prevalentes de actinomicetos isolados de processo de compostagem, avaliar a atividade biocida destes contra bactérias e leveduras com relevância clínica e verificar a produção de enzimas extracelulares visando o potencial biotecnológico destes isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Compostagem

A compostagem é um processo biológico natural de degradação da matéria orgânica realizado no ambiente pelos microrganismos aeróbios. A metabolização destes compostos orgânicos resulta na mineralização e humificação. Pois os microrganismos utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono e nitrogênio (Hartlieb et al., 2001). A decomposição biológica e a estabilização de substâncias orgânicas em condições controladas produzem um produto final estável, o qual pode ser aplicado no solo com grandes benefícios (Madejón et al., 2002). Segundo Barrington et al. (2002) a compostagem é um dos poucos processos biológicos capaz de estabilizar resíduos orgânicos. Neste processo de estabilização ocorre a eliminação da maioria dos microrganismos patogênicos ao homem, reduzindo-se consideravelmente a emissão de odor, através da redução dos níveis de hidrocarbonetos biodegradáveis.

Pelo fato de se tratar de um processo aeróbio, os microrganismos característicos durante este processo são aeróbios ou anaeróbios facultativos. (Weppen, 2001). Os microrganismos transformam a matéria orgânica em CO₂, biomassa, calor e um produto final semelhante a húmus. A capacidade dos

microrganismos em assimilar a matéria orgânica rica em proteínas, carboidratos, lipídios e ligninas depende da sua habilidade em sintetizar as enzimas necessárias para a degradação dos substratos (Tuomela et al., 2000).

A matéria orgânica decomposta através do metabolismo microbiano, pela ação de enzimas como proteases, lipases, pectinases e celulasas (Wei et al., 2000) podem reduzir à metade o volume inicial do material durante o processo (Gómez, 1998). Desta maneira a compostagem proporciona uma redução de resíduos, bem como a continuidade do ciclo biológico podendo retornar ao solo minerais e outras substâncias que foram retiradas durante os cultivos agrícolas (Bertoldi, 1995; Jahnel et al., 1999).

Segundo Fogarty e Tuovinen (1991), a compostagem está dividida em quatro estágios microbianos relacionados com a temperatura: fase dos psicrófilos, fase dos mesófilos, fase dos termófilos e a fase final de maturação. Com as mudanças na temperatura, ocorrem alterações relativas na composição da população microbiana.

A duração de cada estágio na compostagem depende da natureza da matéria orgânica em decomposição e da eficiência do processo. O material a ser compostado no início do processo encontra-se à temperatura ambiente, sendo levemente ácido. As fontes de carbono solúveis facilmente degradáveis como os monossacarídeos, o amido e os lipídios são consumidos pelos microrganismos na primeira fase do processo e o pH diminui pela formação de ácidos orgânicos.

No próximo estágio os microrganismos degradam proteínas, liberando assim amônia provocando o aumento do pH. Após a exaustão das

fontes de carbono mais facilmente degradáveis, os compostos mais complexos como a celulose e a lignina são parcialmente transformados em húmus (Tuomela et al., 2000).

A primeira fase, psicrófila, caracteriza-se por apresentar temperaturas entre 10°C e 25°C podendo durar 1 ou 2 dias e nela os microrganismos metabolizam compostos solúveis de fácil degradação. Com o aumento da atividade metabólica há liberação de energia e aumento na temperatura no interior da leira. A fase mesofílica é alcançada com temperaturas entre 25°C e 45°C e o processo de transformação da matéria orgânica continua com o aumento da temperatura até atingir a fase termofílica. Esta fase, caracterizada por temperaturas mais altas (45°C a 65°C) acontece a maior taxa de degradação dos compostos podendo durar várias semanas (Fogarty & Tuovinen, 1991). Nesta fase ocorre a eliminação dos microrganismos patogênicos e ocorre a predominância de actinomicetos e fungos filamentosos, os quais são responsáveis pela degradação dos substratos quimicamente mais complexos.

Após a fase ativa de degradação ou bioestabilização ocorre à fase de maturação, há um decréscimo da temperatura devido à diminuição da atividade microbiana e a recolonização da comunidade microbiana mesofílica (Fogarty & Tuovinen, 1991). O composto pode ser aplicado diretamente em culturas anuais, perenes e semiperene.

2.2. Actinomicetos

Os actinomicetos compreendem um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas que filogeneticamente pertencem ao ramo das bactérias Gram positivas. A diversidade morfológica dos actinomicetos está baseada primeiramente nas suas estratégias reprodutivas as quais levam à formação de uma variedade de estruturas de esporos, como artrósporos em *Streptomyces*, endósporos dos *Thermoactinomyces*, aleuriósporos característicos do gênero *Micromonospora* e os zoósporos móveis como em *Oerskovia*, *Geodermatophilus* e *Kitasatoa* (Ensign, 1978).

Os esporos de *Streptomyces* são poucos resistentes ao calor, sendo metabolicamente menos ativos do que as células vegetativas, porém, possuem enzimas e sintetizam substratos endógenos e exógenos. Os endósporos dos *Thermoactinomyces* apresentam morfologia semelhante quanto à estrutura dos esporos dos *Bacillus*, contendo grandes quantidades de íons cálcio e magnésio, além de ácido dipicolínico.

Os membros da família *Actinoplanacea* caracterizam-se por apresentarem esporos móveis dentro de um esporângio. Os membros desta família dividem-se em dois grupos: um grupo caracteriza-se por apresentar um esporângio esférico contendo milhares de esporos e o segundo grupo produz 3 ou 4 esporos dentro de um esporângio semelhante a dedos.

Estes microrganismos são aeróbios, sendo que alguns gêneros são facultativos ou anaeróbios obrigatórios. Metabolicamente podem ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou fototróficos (Kennedy, 1999). Estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em vários habitats, como na água, plantas em decomposição, nódulos de raízes das

plantas, sedimentos, lodo ativado, fezes de animais e produtos alimentícios, porém o seu hábitat principal é o solo (McCarthy & Williams, 1990). Kennedy (1999) em seus estudos afirmou que 30% da população total de microrganismos no solo correspondem aos actinomicetos. Segundo Iwai & Takahashi (1992) 80% dos actinomicetos do solo ocorrem na camada mais superficial (0-10cm), diminuindo progressivamente com a profundidade. A ocorrência de actinomicetos em ambientes aquáticos pode estar associada à lixiviação do solo.

A grande diversidade microbiana e em particular a população de actinomicetos que ocorre em hábitats naturais, pode muitas vezes ser alterada pela atividade do homem através do uso de compostos químicos. Favorece-se assim a predominância de determinados actinomicetos como o gênero *Nocardopsis* isolado de solos tratados com clordane ou provoca-se a prevalência de *Nocardia* e *Micromonospora* em solos enriquecidos com lodo ativado (Orchard & Goodfellow, 1980; Percich & Lockwood, 1978).

Os actinomicetos são essenciais na decomposição dos compostos orgânicos e dos poluentes ativos na natureza (Groth et al., 1999), degradando materiais orgânicos no solo, incluindo a lignina e outros polímeros recalcitrantes.

Os actinomicetos em geral e em particular o gênero *Streptomyces* são conhecidos por possuir muitas espécies que podem inibir o desenvolvimento de alguns fitopatógenos "in vitro", atuando como antagonistas de fungos e outros microrganismos colonizadores de raízes.

Os actinomicetos também produzem inúmeros compostos químicos como a tiamina, a riboflavina, a vitamina B₁₂ (cianocobalamina), as flavoproteínas, várias porfirinas, as quais contêm compostos com ferro e coenzimas que podem promover ou inibir o crescimento de outros organismos (Kennedy, 1999). São importantes degradadores de pesticidas tais como: organoclorados, triazinas simétricas, triazinonas, carbamatos e acetanilidas podendo ocorrer a utilização destes compostos como única fonte de carbono e energia para o seu metabolismo (Schrijver et al., 1999).

Os *Streptomyces* destacam-se entre os actinomicetos pela capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas com aplicação industrial como as oxidoreduases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e sintases. No meio ambiente eles desempenham uma função importante na formação do húmus pela produção de enzimas extracelulares usadas na degradação de compostos celulolíticos (Padilha, 1998). Além disto produzem cerca de 75% dos antibióticos comercialmente importantes (Miyadoh, 1993) e aproximadamente 60% destes compostos bioativos tem sido usados na agricultura. Os actinomicetos podem ocorrer também na rizosfera e no rizoplano de muitas plantas sendo que o gênero *Frankia* fixa nitrogênio em nódulos de plantas não-leguminosas (Heuer et al., 1997).

Os gêneros *Nocardia* e *Rhodococcus* são componentes da microbiota do solo decompondo compostos químicos prejudiciais ao meio ambiente. O gênero *Rhodococcus* desempenha importante papel nos processos de bioremediação e biodegradação. Sendo encontrado em ambientes contaminados com hidrocarbonetos ou outros compostos químicos. Os

membros deste gênero conseguem degradar poluentes hidrofóbicos porque as suas células aderem às interfaces água/óleo. Este fato ocorre devido ao grupo possuir cadeias alifáticas de ácidos micólicos na sua parede celular. Além disso, desempenham importante papel na imobilização de metais pesados e na produção de surfactantes, amidos e polímeros (Bell et al., 1998). Outro membro nocardioforme conhecido como coprofílico pois ocorre em esterco animal é o *Rhodococcus coprophilus*. A presença deste actinomiceto em rios e lagos é um indicador da contaminação fecal por animais herbívoros (Rowbotham & Cross, 1977; Mara & Oragui, 1981). Os estudos ecológicos mostram que este actinomiceto sobrevive à passagem através do rúmen e intestino dos animais poligástricos atingindo as fezes onde ocorre o seu crescimento.

2.3. Actinomicetos em processo de compostagem

A reciclagem de nutrientes no ambiente requer a ação da comunidade microbiana na qual os actinomicetos são importantes degradadores primários. Estes microrganismos são numerosos no processo de compostagem desempenhando funções essenciais na degradação de resíduos orgânicos degradando moléculas complexas e recalcitrantes, como celulose, lignina e lignocelulose (Ouhdouch et al., 2001).

A maioria dos estudos com actinomicetos em processo de compostagem têm sido realizado em compostos de cogumelos (basideomicetos), havendo nestes a predominância de *Streptomyces sp.*, *Micromonospora sp.* e raramente *Thermoactinomyces*, *Thermonospora sp.* e *Actinobifida sp.* Neste tipo de material os actinomicetos atuam sobre substratos ricos em manano, xilano, hemiceluloses, celulosas, ligninas e demais materiais

orgânicos (Lacey, 1997). Durante o processo de compostagem os actinomicetos podem apresentar contagens em torno de $1,2 \times 10^{10}$ cfu/g depois de 10 dias a 50°C. A população costuma diminuir gradativamente em temperaturas de 65°C, porém, o crescimento é inibido em temperaturas inferiores a 28°C e superiores a 75°C (Lacey, 1997).

Há poucos estudos sobre o desenvolvimento de actinomicetos em compostagem de resíduos domésticos, mas a sua evidência é demonstrada pelo grande número de esporos aéreos quando o composto é manejado. Os resíduos domésticos frescos contém poucos actinomicetos (Lacey, 1997). Contudo, os números aumentam rapidamente com a evolução do processo (Dees & Ghiorse, 2001). Eles aparecem predominantemente durante a fase termofílica e na fase de maturação da compostagem e ocasionalmente tornam-se tão numerosos podendo ser visíveis na superfície do composto (Tuomela, 2000). Os gêneros predominantes em leiras de compostagem são *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora* (Lacey, 1997; Oliveira, 2002; Tuomella et al., 2000).

2.4. Identificação e classificação dos actinomicetos

A filogenia e sistemática de actinomicetos têm sido alvo de intensas pesquisas, envolvendo a análise morfológica, as propriedades quimiotaxonômicas e as técnicas moleculares. De acordo com Embley & Stackebrandt (1994) vários estudos já foram realizados objetivando a construção de árvores filogenéticas deste grupo de microrganismos. Kluwyer & Van Niel (1936-1941) foram os primeiros a reportarem árvores filogenéticas

incluindo os actinomicetos. De acordo com os seus esquemas as formas morfológicamente complexas, como os actinomicetos, evoluíram de formas esféricas simples, assim, os actinomicetos formadores de micélios deram origem aos proactinomicetos, às micobactérias e às corinebactérias; as formas ramificadas originaram as bactérias do ácido láctico e do ácido propiônico. Por volta de 1965 foi proposta por Krasil'nikov a origem de várias linhagens bacterianas individuais, segunda a qual a classe Actinomycetes teria evoluído de um ancestral que deu origem aos fungos.

Prauser (1974) baseou-se na morfologia para descrever as tendências evolucionárias propondo que os nocardioformes com micélio representavam o estágio intermediário entre os corineformes pleomórficos e os actinomicetos morfológicamente complexos. Stanley et al. (1989) colocaram os actinomicetos dentro da classe *Tallobacteria* da divisão *Firmicutes*, porém esta classe agrupava organismos muito distintos como as bactérias Gram-positivas simples e os actinomicetos. Stackebrandt et al. (1997) propuseram a classe *Actinobacteria*, onde consideraram três fatores: i) o estabelecimento de propriedades quimiotaxonômicas observando-se as diferenças na composição química dos constituintes da célula, ii) as similaridades entre DNA fita única de espécies proximalmente relacionadas e iii) a determinação de similaridades de seqüências 16S rRNA e rDNA entre as linhagens em geral.

O Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, os actinomicetos são classificados dentro do Filo e da classe *Actinobacterias*, com 6 ordens, 39 famílias, 139 gêneros e várias espécies. As actinobactérias dividem duas

características, são Gram-positivas e apresentam alta proporção de guanina e citosina em seu DNA, excedendo 70% do total de bases nucleotídicas.

As características morfológicas tais como a ramificação do micélio sobre o substrato, a formação de micélio aéreo e a sua fragmentação ou produção de esporos são fatores que auxiliam na identificação destes microrganismos.

Com o auxílio do microscópio eletrônico algumas importantes informações adicionais são fornecidas com relação à superfície dos esporos. Desta forma os actinomicetos representam um grupo diversificado de microrganismos que taxonomicamente são classificados pela composição e estrutura de sua parede, pela morfologia e coloração do micélio e esporângio, pelas características da superfície e arranjo dos conidiósporos, pela percentagem de G-C em seu DNA, pela composição fosfolipídica da membrana celular e a resistência dos esporos ao calor. Classificam-se também pelos resultados de várias provas bioquímicas nas quais são avaliadas a utilização de diversas fontes de carbono e nitrogênio, a produção de enzimas extracelulares e de diferentes concentração de sais.

Os recentes progressos em biologia molecular e genética de populações têm aumentado a quantidade de informações disponíveis para a classificação de microrganismos relativamente próximos (Kataoka et al., 1997; Peteres et al., 2000; Roberts & Crawford, 2000). A aplicação de técnicas moleculares para amostras ambientais tem possibilitado a análise da diversidade microbiana sem a necessidade de cultivá-las. Os procedimentos de cultivo podem inevitavelmente favorecer o crescimento de alguns membros, enquanto outros

são inibidos ou não cultiváveis. As técnicas de cultivo subestimam a diversidade presente nos diferentes ambientes. Os marcadores moleculares genéticos são excelentes ferramentas para avaliar a diversidade e as relações genéticas. As técnicas de biologia molecular tem sido utilizadas para aprimorar classificações, especialmente aquelas técnicas objetivando as regiões genômicas 16S rRNA (Embley & Stackebrandt, 1994).

A análise da seqüência de proteínas e ácidos nucléicos tem sido utilizada para determinar as relações filogenéticas entre os diferentes grupos de actinomicetos e gêneros relacionados. O desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores específicos são importantes para a caracterização, análise filogenética, triagem para compostos bioativos e pesquisas ecológicas básicas (Stackebrandt et al., 1997).

Devido às inúmeras aplicações biotecnológicas destes microrganismos, principalmente *Streptomyces* e sendo um problema o longo tempo necessário para o isolamento e identificação destes organismos utilizando as provas bioquímicas tradicionais, as técnicas moleculares têm sido amplamente usadas. Através de técnicas baseadas em biologia molecular busca-se uma forma mais rápida e precisa para o processo de identificação. Morciardini et al. (2002) desenharam cinco pares de oligonucleotídeos iniciadores para a identificação da ordem Actinomycetales e de quatro famílias (*Streptomycetaceae*, *Micromonosporaceae*, *Streptosporangeaceae* e *Thermomonosporaceae*), com estes oligonucleotídeos apresentando uma especificidade entre 97e 98%. A análise da seqüência do gene 16S rDNA tem sido utilizadas em diversos trabalhos (Kataoka et al., 1997; Roberts &

Crawford,2000), porém as análises das seqüências das regiões 23S e 5S do rDNA também são empregadas (Mehling et al., 1995).

2.5. Metabolismo secundário

As atividades metabólicas associadas ao crescimento e à reprodução dos organismos são extraordinariamente uniformes. A diversidade da arquitetura e a função no mundo natural são determinadas pela quantidade de relações e disposições de um pequeno número de unidades monoméricas reunidas dentro de estruturas macromoleculares. Para fornecer esses monômeros e as várias enzimas necessárias para a manutenção da célula, uma rede de vias biosintéticas estão envolvidas. Os metabólitos associados com este processo vital da célula são designados como primários. Contudo, existem nos organismos diversas substâncias às quais não podem ser atribuídos um papel bioquímico em tais vias primárias. Estas substâncias são heterogêneas na sua estrutura e distribuição estando restrita a poucos compostos e aparecendo apenas em alguns organismos. Alguns destes compostos são encontrados em poucos padrões denominados assim metabólitos secundários (Bu' Lock, 1974).

Conceitualmente o metabolismo secundário revela a sua ausência na função metabólica essencial em organismos produtores (Martin & Demain, 1980). Uma das características destes compostos é que eles são freqüentemente produzidos depois dos processos celulares associados ao crescimento. O metabolismo secundário pode ser reconhecido como um fenômeno geral de manutenção de algumas espécies. Usualmente é associado

com plantas e microrganismos mas existem uma variedade de exemplos no reino animal (Mann, 1978).

O metabolismo secundário microbiano tem propiciado intensas pesquisas com substâncias bioativas que podem ser usadas em medicina. Muitas destas substâncias são antibióticos que possuem inúmeras aplicações na indústria farmacêutica e na agricultura. As riquezas de recursos químicos naturais disponíveis como resultado das atividades metabólicas secundárias dos organismos são enormes (Woodruff, 1980).

Os actinomicetos produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, provavelmente refletindo as diferenças de habitats e estratégias de sobrevivência dos mesmos. Outros grupos microbianos bem conhecidos pela produção de metabólitos secundários bioativos incluem as cianobactérias e as mixobactérias (Harvey, 2000). Embora esses organismos sejam mais promissores na área da oncologia (Burja et al., 2003; Harada, 2004), uma pesquisa reportou a capacidade de mixobactérias de produzir substâncias bioativas contra bactérias Gram-negativas (Gaspari et al., 2005).

Os fungos filamentosos são organismos eucariotos que produzem uma ampla variedade de produtos naturais. Em muitos casos os benefícios que estes compostos conferem aos organismos são ainda desconhecidos (Bu'Lock, 1961). Os fungos são também produtores versáteis de metabólitos isoprenóides e sintetizam uma variedade de substâncias derivadas de aminoácidos, açúcares e nucleosídeos.

O metabolismo secundário em plantas é amplamente diversificado, tendo como exemplos os alcalóides e glicosídeos entre outras substâncias com

propriedades medicinais. Os óleos essenciais representam a maior série de produtos produzidos pelas plantas.

No reino animal, os artrópodes e outros insetos produzem metabólitos secundários que funcionam na comunicação entre as espécies e na sua proteção (Tursch et al., 1976). Estas substâncias servem como sinais químicos que mediam as interações entre animais e os seus habitats. Eles incluem os ésteres voláteis, (feromônios) que agem como marcadores territoriais, os agentes tóxicos ou defensivos irritantes tais como as benzoquinonas e o ácido fórmico (Tursch et al., 1976).

2.5.1. Antibióticos

Os antibióticos são compostos químicos específicos produzidos por organismos vivos capazes de inibir em baixas concentrações os processos vitais de uma ou mais espécies de microrganismos (Korolkovas, 1999). São importantes para a medicina terapêutica, desempenhando funções antimicrobianas, antifúngicas, antitumorais, imunossupressoras e na agricultura através dos herbicidas (Ouhdouch et al., 2001).

2.5.2. Actinomicetos produtores de substâncias bioativas

Os actinomicetos têm a capacidade genética de sintetizar muitos metabólitos secundários biologicamente diferentes, de importância econômica tais como: antibióticos, vitaminas e enzimas (McCarthy & Williams, 1990; Sanglier et al., 1996; Horan, 1999; Lazzarini et al., 2000).

Padrões de espécies de *Streptomyces* caracterizam-se por sua excelente capacidade de produzir compostos bioativos, sendo antibióticos derivados deste

gênero foi descoberto em 1942 com a produção da estreptomicina (Berdy, 1974; Vandamme, 1974; Waksman, 1963). Entre 1955 e 1962, 80% dos antibióticos originados entre os actinomicetos, foram produzidos pelo gênero *Streptomyces* (Berdy, 1974). Em adição, eles são uma das maiores comunidades da população microbiana presente no solo, e sua ocorrência é muito influenciada pelas condições ambientais, umidade, temperatura, pH e vegetação. Estudos taxonômicos de *Streptomyces* realizados por Williams et al. (1983b) indicam a distribuição característica entre os grupos de espécies produtores de compostos bioativos.

Vários outros antibióticos são produzidos por actinomicetos entre eles estão anfotericina B produzido por *Streptomyces nodosus*, ativos na membrana celular de fungos, eritromicina eficiente contra bactérias Gram positivas, atuando na síntese protéica, produzido por *Streptomyces erythreus*; neomicina, usada com frequência em infecções de pele, ouvidos e olhos, sendo sintetizado por *Streptomyces fradiae*; estreptomicina que atua em bactérias Gram negativas, aeróbias e certas micobactérias, produzido por *Streptomyces griseus*; a tetraciclina produzida por *Streptomyces rimosus*; a rifamicina eficiente no tratamento da tuberculose; tobramicina com atividade antibacteriana semelhante; a gentamicina produzido por *Streptomyces tenebrarius* (Saadaum & Gharaibeh, 2003), são alguns antimicrobianos produzidos por diferentes espécies de *Streptomyces*.

Os actinomicetos são qualitativa e quantitativamente importantes na rizosfera. Segundo Crawford et al. (1993), eles podem influenciar o crescimento de plantas, proteger as raízes da invasão de fungos patogênicos, podendo

desta maneira, serem utilizados no controle biológico de doenças em plantações. A maioria dos actinomicetos endofíticos isolados apresentam atividade antibiótica contra bactérias Gram-positivas e *Candida albicans* e fraca atividade contra bactérias Gram-negativas (Stamford, 1997).

2.6. Actinomicetos produtores de enzimas com potencial biotecnológico

O papel das enzimas em muitos processos têm sido investigado durante muito tempo. Sua existência foi associada com a história da Grécia antiga, onde os antigos usavam as enzimas de microrganismos na produção de álcool, em bebidas, na produção de queijos, etc (Demirjan et al., 2001).

Microrganismos ou suas enzimas são usados em uma variedade de atividades biotecnológicas tais como: hidrólise de polímeros, síntese de compostos, descontaminação de solos, entre outras. Entre as atividades, o melhoramento dos processos industriais usando as enzimas produzidas por microrganismos é um importante campo na pesquisa. Isso devido às reações catalisadas que são altamente eficiente e seletivas, menos poluentes, usualmente requerem menos energia, bem como baixos custos (Cherry & Fidantsef, 2003). Entre as várias enzimas de importância industrial destacam-se: amilases, celulasas, esterases, lipases, pectinases e proteases.

2.6.1. Amilases

O amido é uma abundante fonte de carbono na natureza, e α -amilases (1,4- α -glucano hidrolase), hidrolisam ligações α -1,4-glicosídica nas moléculas de amido, é uma das várias enzimas envolvidas na degradação deste polímero (Paquet et al., 1991).

A indústria do amido é uma das maiores consumidoras de enzimas para hidrólise e modificações da matéria bruta (Bajpai & Sharma, 1989). O polímero de amido, assim como outros polímeros, requerem a combinação de enzimas para a sua completa hidrólise, incluindo α -amilases, gluco-amilases ou β -amilases e isoamilases (Poonam & Dalel, 1995). A hidrólise do amido compreende 30% do consumo de enzimas no mundo (Van Der Maarel et al., 2002) e programas para selecionar novos microrganismos para a produção têm aumentado consideravelmente. Actinomicetos são um dos grupos mais investigados devido ao seu potencial biotecnológico (Lealem & Gashe, 1994). A ocorrência de amilases em actinomicetos é uma característica comumente observada em *Nocardia* e *Streptomyces* (Vigal et al., 1991). Entre outros microrganismos produtores de amilases, o gênero *Bacillus* apresenta capacidade de produzir esta enzima em temperaturas que podem variar de 55°C a 80°C (Brown, 1987). *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, também são alguns dos produtores de amilase.

2.6.2. Celulases

As celulases têm sido investigadas principalmente pelo seu uso industrial, na bioconservação da biomassa na agricultura, no uso de aditivos para detergentes. A atual proporção no total da produção de enzimas destinadas a produção de detergentes excede a 30% (Horikoshi, 1996). Estas enzimas são fontes orgânicas mais abundantes de alimentos, combustíveis e outros produtos químicos (Spano et al., 1975) consistem de unidades de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas em um modo linear.

Nos atuais processos industriais, enzimas celulolíticas são usadas na clarificação de sucos de frutas, na extração de sucos, óleo de sementes, no processamento de ração animal para melhorar a digestibilidade de animais monogástricos, em detergentes com funções de amaciantes, na estonação de jeans, no pré-tratamento da biomassa que contém celulose para melhorar a qualidade nutricional na estocagem e no pré-tratamento de resíduos industriais (Buchert et al., 1997; Niehaus et al., 1999; Bhat, 2002; Nakamura et al., 2001; Van Wyk et al., 2001; Malek et al., 1988). Aplicação desta enzima têm despertado grande interesse nas indústrias têxteis, no tratamento de papéis e de polpas para a remoção ou hidrólise parcial de resíduos de xilana para o seu branqueamento (Bisaria & Ghose, 1981; Bhat & Bhat, 1997).

A produção de celulasas por microrganismos é dependente do controle da regulação de mecanismos genéticos e bioquímicos. Os microrganismos celulolíticos têm desenvolvido um complexo enzimático com especificidades diferentes na atuação sobre as regiões amorfas ou cristalinas da celulose, ou a preferência por substratos de cadeias de diferentes comprimentos. Esta diversidade está relacionada, em parte, com a necessidade de competir com a heterogeneidade física do substrato, sendo que a estrutura da celulose é modificada durante o processo de hidrólise, necessitando de enzimas em tempos diferentes (Béguin & Aubert, 1994; Bisaria & Ghose, 1981).

Apesar das inúmeras aplicações, parece que a maior utilização destas enzimas é na conversão à glicose e a posterior fermentação a solventes e combustíveis (Bhat & Bhat, 1997; Howard et al., 2003).

Os microrganismos celulolíticos estão presentes em grupos taxonômicos extremamente variados sendo que a grande maioria é pertencente às eubactérias e fungos. Estes organismos celulolíticos ocorrem em biotas com acúmulos de resíduos de celulose. Embora os microrganismos degradadores de celulose estejam distribuídos em grupos diversificados, os sistemas de celulases de bactérias e fungos têm sido estudados mais detalhadamente.

Os gêneros que apresentam atividade celulolítica dentre os actinomicetos são *Microbispora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora*, incluindo actinomicetos mesofílicos e termofílicos (Crawford & McCoy, 1972; Gallagher et al., 1996; Ishaque & Kluepfel, 1980; Tuncer et al., 2004; Yazdil et al., 2000). Segundo Li et al. (1997; 1998) as celulases produzidas por *Streptomyces sp.* apresentam uma ótima atividade em temperaturas que variam de 50°C a 55°C, sendo estáveis em uma ampla faixa de pH.

2. 6. 3. Esterases

Esterases (EC 3.1.1.1) e lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações de ésteres e são amplamente distribuídas em animais, plantas e microrganismos. As esterases são definidas como enzimas que hidrolisam os triglicerídeos em pequenas cadeias e preferem substratos solúveis em água (Bornscheuer, 2002).

As esterases podem ser usadas em solventes orgânicos, tornando-se uma das enzimas mais amplamente usadas na síntese orgânica e em vários processos industriais (na indústria de detergentes, na indústria de alimentos, na indústria oleoquímica, na indústria do papel) (Sharma et al., 2001).

Lipases e esterases apresentam atividade em uma ampla variedade de substratos, os quais não requerem a adição de cofatores. Assim, elas são muito usadas na produção de sabores, reciclagem do papel, resolução de misturas racêmicas e sínteses químicas (Jaeger et al., 1999).

Esterases desempenham um papel importante na síntese de alguns medicamentos de importância clínica. Esterases de *Trichosporon brassicae* e outros microrganismos tais como *Rhodococcus sp.*, *Bacillus circulans* podem produzir em ampla escala compostos de uso terapêutico. Esterases de *Pseudomonas sp.* produzem drogas como ibuprofeno, usados como antiinflamatório (Kim et al., 2002). Segundo Biely et al.(1996) a degradação de etileno glicol bem como a hidrólise da aspirina são realizados por *Streptomyces lividans*.

Na indústria também são usados compostos derivados de polímeros no acondicionamento ou como um componente em produtos manufaturados. Alguns materiais poluentes tais como plásticos, poliuretano, poliésteres, polietileno glicol são também gerados. Para degradar tais compostos, a esterase e poliuretanases são amplamente usadas (Jahangir et al., 2003).

2.6.4. Lipases

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases. E.C. 3.1.1.3) são enzimas consideradas de significância fisiológica e potencial industrial. São grupos de enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos e glicerol na interface entre a fase aquosa e lipídica (Veeraragavan, 1990; Thomson et al., 1999). Em eucariontes as lipases estão envolvidas em vários estágios no metabolismo dos lipídios. Em plantas as

lipases são encontradas em tecidos de reserva de energia (Balashev et al., 2001).

Muitas lipases são ativas em solventes orgânicos, onde elas catalisam um número significativo de reações incluindo a esterificação (Chowdary et al., 2001; Hamsaveni et al., 2001; Kiran et al., 2001; Kiyota et al., 2001; Krishna & Karanth, 2001) e transesterificação.

Este grupo de enzimas possui importantes aplicações no processamento químico orgânico, na formulação de detergentes, na síntese de biosurfactantes, na indústria oleoquímica, na indústria de laticínios, na indústria agroquímica, na manufatura do papel, na nutrição, em cosméticos e processamentos na indústria farmacêutica (Liese et al., 2000). As lipases são usadas para acelerar a degradação de resíduos gordurosos (Masse et al., 2001).

As gorduras e os óleos são constituintes importantes nos alimentos. O valor nutricional e sensorial e as propriedades físicas de um triglicerídeo são grandemente influenciadas pelos seguintes fatores: a posição dos ácidos graxos no glicerol e o comprimento das cadeias de ácidos graxos, bem como o seu grau de insaturação. Lipases modificam as propriedades dos lipídios pela alteração da localização de ácidos graxos nas cadeias (Colman & Macrae, 1980). Em adição, as lipases têm sido usadas na produção de sabores em queijos, produtos para panificação, em bebidas, auxiliam na remoção de gorduras em carnes e peixes (Kazlauskas & Bornscheuer, 1998).

As lipases são produzidas por muitos microrganismos procariotos e eucariotos superiores. Muitas lipases comercialmente importantes são de

origem microbiana, dentre eles destacam-se *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida tropicalis*, *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e dentre os actinomicetos gênero *Streptomyces* sp.(Sztajer et al., 1988).

2.6.5. Pectinases

A biodegradação da pectina, um polissacarídeo construído principalmente pela ligação α -1,4-do ácido D-galacturônico e seu metilesteres que ocorrem como resultado da ação sinérgica de diferentes enzimas, (Osborne & Dehority, 1989; Voragen et al., 1980), que podem ser classificadas em dois grupos principais: metilesterases que removem os grupos metoxil da pectina, e depolimerases (hidrolases e liases) que clivam as ligações entre as unidades de galacturonato. As pectinases são encontradas em plantas e microrganismos tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Whitaker, 1989).

As pectinases são de grande importância biotecnológica para a indústria. Elas são utilizadas no setor comercial, especialmente na indústria de sucos, onde são empregadas na viscosidade e turbidez do produto e na de alimentos (Kashyap et al., 2000) e na indústria de papel (Beg et al., 2001; Viikari et al., 2001). São de extrema importância para as plantas, pois ajudam na extensão da parede celular (Ward & Moo-Young, 1989). Também auxiliam na manutenção do balanço ecológico devido à decomposição e reciclagem de resíduos de plantas.

Microrganismos patogênicos devem penetrar em barreiras de carboidratos da parede celular do hospedeiro. Portanto, enzimas que são essenciais para a degradação dos componentes da parede celular são importantes para a sua infecção em plantas, as enzimas pectinolíticas ocupam um papel essencial na infecção dos hospedeiros (Chatterjee & Starr, 1980).

As pectinases são usadas na produção de ração para animais, reduzindo a viscosidade com ao aumento da absorção de nutrientes e hidrolisando fibras não biodegradáveis ou pela liberação de nutrientes bloqueados nessas fibras (Hoondal et al., 2000).

O tratamento de pectinases acelera a fermentação de chás, e também destrói a formação de espumas (Carr, 1985). Elas também são usadas na fermentação do café removendo mucilagens que recobrem os grãos de café. Quase todas as preparações comerciais de pectinases são produzidas por fontes fúngicas (Singh et al., 1999). *Aspergillus niger* é a espécie fúngica mais utilizada na produção industrial de enzimas pectinolíticas (Kotzekidov, 1991; Naidu & Panda, 1998).

O sistema pectinolítico em actinomicetos é limitado. Estudo de actinomicetos pectinolíticos tem principalmente revelado a presença de pectato liases (Sato & Kaji, 1981; Spooner & Hammerschmidt, 1989). Em *Streptomyces* sp. e alguns actinomicetos termofílicos do gênero *Thermomonospora* sp. tem revelado a presença de pectinas as quais foram purificadas e caracterizadas (Stutzenberger, 1987).

2.6.6. Proteases

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas de uso industrial, as quais são geralmente classificadas em duas categorias (exopeptidases, que clivam aminoácidos no final da cadeia de proteínas e endopeptidases, que clivam ligações peptídicas sem as proteínas) (Rao et al., 1998). Estas enzimas são usadas em alimentos, produtos farmacêuticos e na indústria do couro e indústria têxtil (Cowan, 1996; Fan et al., 2001; Mozersky et al., 2002).

Economicamente as enzimas industriais mais importantes são produzidas por bactérias (*Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*) fungos (*Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Saccharomyces sp.*) e actinomicetos (*Streptomyces sp.*) (Kumar, 1998).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

3.1. Coleta das amostras

Para a realização deste trabalho foi avaliada uma leira de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro, do Departamento Municipal de Limpeza Urbana (DMLU) no município de Porto Alegre.

A leira recebeu resíduos orgânicos domésticos com cerca de 30% de material exclusivamente de origem vegetal (hortifrutigranjeiros) de supermercados.

Para avaliar a diversidade de microrganismos presentes no processo de compostagem, essa leira foi acompanhada desde a fase inicial (montagem) até o final do processo. As coletas quinzenais foram realizadas de julho de 2003 até janeiro de 2004, perfazendo um total de 10 coletas.

O material que estava sendo compostado foi coletado em diferentes pontos e profundidades, depois reunido em saco plástico formando uma amostra de aproximadamente 3kg. O material foi armazenado e homogeneizado em saco plástico e após acondicionado em ambiente refrigerado. Após a coleta as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para os ensaios de isolamento e identificação dos actinomicetos.

3.2. Isolamento dos actinomicetos

Das amostras coletadas foram retiradas 10g e após, suspensas em 90 mL de água estéril obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . Esta diluição foi incubada a 37°C durante 10 min e após 50°C por mais 10 min e depois, diluições seriadas foram realizadas. As diluições 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas em triplicatas em placas de Petri, contendo ágar amido caseína (ACA) (9.1.1) através da técnica de espalhamento em superfície (Antunes, 1995) e incubadas a 37°C durante um período de 10 dias. Depois procedeu-se às contagens das colônias características de actinomicetos, com posterior isolamento das colônias em caldo TSB. Após a incubação uma alíquota dos isolados foi conservado em 20% de glicerol e mantido à temperatura de -20°C .

3.3. Recuperação da amostra congelada

Uma alíquota de 100 μL do isolado armazenado em glicerol foi semeada em 10mL de caldo amido caseína (AC), incubada por 48h a 40°C sob agitação constante de 170 rpm. Verificado o crescimento microbiano 100 μl foi semeado em placas contendo meio ACA através da técnica de espalhamento de

superfície com o auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 37°C por no mínimo 7 dias. Após o crescimento das colônias com características morfológicas de actinomicetos os isolados foram repicados em placas contendo ACA pelo método de esgotamento, para purificação das colônias.

3.4. Coloração de Gram

Após o crescimento nas placas de ACA foi realizada a coloração de Gram de uma colônia com objetivo de verificar a pureza de cada cultura e se os microrganismos eram Gram-positivos ou Gram-positivos variáveis, apresentavam forma filamentosa ou fragmentada em bacilos, cocos ou cocobacilos. Uma vez certificada a pureza da mesma, a colônia foi crescida em AC como descrito anteriormente e uma nova alíquota foi congelada e outra foi semeada em tubos com ACA inclinado para posterior uso na identificação bioquímica e morfológica.

3.5. Identificação morfológica

Depois de realizada a coloração de Gram das amostras, as mesmas foram submetidas à análise das características morfológicas microscópicas. A análise das características morfológicas foram realizadas através do microcultivo de cada um dos isolados conforme Holt et al. (1989). O microcultivo foi montado em placa de Petri contendo no seu interior dois palitos sobre os quais foi depositada uma lâmina de microscópio e ao lado um pedaço de algodão 3cm x 3cm. Cada conjunto foi embalado e esterilizado por 2h 30min no forno de Pasteur. Após, com auxílio de uma micropipeta foi adicionado sobre a

lâmina 500µL de ágar tripticase de soja (TSA). Solidificado o meio de cultura o isolado foi inoculado com um palito de madeira estéril, com um risco transversal à lâmina e posteriormente foi adicionado 1mL de água estéril sobre o algodão. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C por no mínimo 10 dias ou até o micélio estar bem desenvolvido. No período de incubação diariamente foram observadas características como ramificação do micélio sobre o substrato, formação do micélio aéreo, fragmentação e produção de esporos. A observação foi realizada em microscópio óptico com o aumento de 400x.

3.6. Identificação bioquímica

A identificação bioquímica dos actinomicetos foi realizada através de 45 provas bioquímicas, as quais avaliaram a utilização de fontes de carbono e nitrogênio, bem como a observação da produção de enzimas extracelulares, coloração do micélio aéreo ou sobre o substrato, conforme a literatura apropriada (Holt et al., 1989; Williams et al., 1983a e Shirling & Gottlieb, 1966). As demais provas bioquímicas foram realizadas segundo a bibliografia utilizada para a identificação de outros grupos microbianos seguindo MacFaddin (2000). Os resultados obtidos foram comparados com as chaves de identificação (Holt et al., 1989; Williams et al., 1983a).

3.6.1. Crescimento sobre uma única fonte de carbono

Durante o experimento foram utilizadas as seguintes fontes de carbono: celobiose, citrato de sódio, D-frutose, D-galactose, D-manose, D-melezitose, D-xilose, lactose, L-arabinose, L-ramnose, maltose, manitol, m-inositol, raffinose, salicina, sacarose e trealose.

Para verificar a metabolização das fontes de carbono acima citadas foi preparado um sistema de 3 placas, sendo que em uma placa continha a fonte de carbono a ser testada, uma outra continha glicose como fonte de carbono (positivo), e a terceira placa sem nenhuma fonte de carbono, era o controle negativo.

O meio de cultura para a utilização da fonte de carbono consistia de ágar basal de sais minerais (9.1.2). Este meio era preparado em triplicata e posteriormente esterilizado em autoclave a 105°C por 10min e após vertido nas placas de Petri.

Cada placa do sistema foi dividida em oito quadrantes e em cada um destes foi inoculado um isolado de actinomicetos. A semeadura foi realizada com o auxílio de uma alça e na forma de estrias. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura de 37°C por 15 dias e após foi analisada a utilização ou não da fonte de carbono, comparando-se o crescimento das bactérias nas diferentes placas do sistema.

3.6.2. Crescimento com uma única fonte de nitrogênio

Nesta análise foram testadas as seguintes fontes de nitrogênio: arginina, cisteína, fenilalanina, histidina, L-metionina, nitrato de potássio, serina, treonina e valina. O meio para utilização das fontes de nitrogênio (9.1.3) segue o descrito em Williams et al.(1983a). Da mesma forma que para as fontes de carbono, três sistemas foram preparados: i) controle negativo com somente o meio basal; ii) controle positivo meio basal suplementado de 0,1% de L-asparagina; e iii) meio basal com a fonte de nitrogênio a ser testada. Nos

sistemas utilizou-se como indicador de pH o azul de bromotimol a 0,3%, que possibilitou uma melhor análise das fontes testadas.

Preparados os três sistemas estes eram autoclavados por 15 minutos a 121°C e posteriormente vertidos em placas de Petri estéreis.

O procedimento para a utilização deste teste foi semelhante ao realizado para as fontes de carbono, ou seja, comparação das placas contendo a fonte de nitrogênio a ser testada com os controles positivo e negativo. Com o uso do indicador de pH observou-se que não houve a alteração da cor do meio quando o isolado utilizava a fonte de nitrogênio a ser testada comparando com o controle positivo, diferentemente do controle negativo no qual ocorria a alteração do meio. Utilizando cisteína e valina foi necessário colocar uma concentração menor de glicose (0,2%) no meio basal devido à alteração completa do meio de cultura em poucos dias de incubação.

3.6.3. Determinação da deoxiribonuclease (DNase)

Para analisar a capacidade dos microrganismos em produzir a deoxiribonuclease (DNase) utilizou-se meio de cultura comercial da Sigma preparado e autoclavado por 15 minutos a 121°C e vertido em placas. A semeadura foi feita em picadas, e incubou-se a 30°C durante 7 dias. Depois, adicionou-se 500µL de HCl 1N ao meio e zonas claras ao redor das colônias foram observadas caracterizando assim resultado positivo.

3.6.4. Degradação da esculina

As placas contendo ágar esculina (9.1.6) foram divididas em seis quadrantes e em cada um deles foi semeado em picada um actinomiceto

diferente. Após um período de 14 dias de incubação a 30°C a degradação da esculina foi confirmada pelo escurecimento do meio ao redor da colônia.

3.6.5. Produção de gás sulfídrico

Os tubos contendo 4mL de caldo nutriente (9.1.8.1) foram inoculados com os actinomicetos. Após a incubação uma fita de papel filtro embebida em solução de acetato de chumbo a 0,1% foi pendurada dentro do tubo. Posteriormente os tubos foram incubados por 5 dias a 37°C. Os tubos com resultados positivos apresentaram coloração escura na fita.

3.6.6. Crescimento em diferentes concentrações de NaCl

A capacidade dos actinomicetos em crescerem à diferentes concentrações de NaCl foi testada semeando os microrganismos em 4mL de meio BHI contendo NaCl (9.1.9) nas seguintes concentrações: 7,10 e 13%. Após 14 dias de incubação a 37°C foram considerados positivos os tubos que apresentaram crescimento.

3.6.7. Redução de nitrato

A redução de nitrato foi avaliada em tubos contendo 2mL de caldo nitrato (9.1.10). Depois de 14 dias de incubação a 37°C a redução de nitrato foi verificada adicionando-se 500µL do reagente A (N-N-Dimetil- α -Naftilamina) e 500µL do reagente B (ácido sulfanílico 0,8%). Os tubos foram agitados e a formação de uma coloração vermelha (resultado positivo) foi observada. Nos tubos com reação negativa foi adicionado pó de zinco. O desenvolvimento de uma coloração vermelha confirmou a presença do nitrato (resultado negativo) e

os tubos que permaneceram com a cor inalterada indicaram que o nitrato foi reduzido a produtos voláteis como o óxido nítrico ou N_2 , considerando-se resultado positivo.

3.6.8. Degradação da tirosina

As placas contendo o meio para a degradação de tirosina (9.1.11) foram divididas em seis quadrantes e em cada um deles foi semeado, em estrias, um actinomiceto diferente. As placas foram incubadas a 37°C por 14 dias. Após este período a capacidade do organismo degradar ou não a tirosina foi analisada através do desaparecimento dos grânulos de tirosina.

3.6.9. Degradação da uréia

A capacidade dos actinomicetos de degradarem a uréia foi analisada pela semeadura dos isolados em caldo uréia da DIFCO, incubando-os a 30°C por 15 dias. Após período de incubação foi verificada a alteração da cor do meio de cultura (resultado positivo).

3.6.10. Degradação da xantina

As placas contendo meio xantina (9.1.12) foram divididas em seis quadrantes. Em cada um foi realizada a semeadura em estrias de diferentes isolados de actinomicetos. Após o período de incubação de 14 dias a 37°C o desaparecimento dos grânulos de xantina inicialmente presentes no meio foi interpretado como resultado positivo.

3.6.11. Pigmentação

3.6.11.1. Cor da massa de esporos

A coloração dos esporos foi determinada inoculando os actinomicetos sobre meio amido+sais minerais em placas (9.1.14) incubadas por 14 dias a 37°C. Após este período a coloração da massa de esporos foi observada em condições pré-estabelecidas, ou seja, sempre no mesmo local, horário e sobre um fundo claro (Williams et al., 1983b).

3.6.11.2. Cor do micélio sobre o substrato

Este parâmetro foi determinado usando culturas com crescimento de 14 dias sobre o ágar glicerol-asparagina (9.1.13). Após o período de incubação as placas foram invertidas e, sob condições padrões, a cor do micélio sobre o substrato foi observada (Williams et al., 1983b).

3.6.11.3. Produção de melanina

Uma alíquota do isolado foi semeada em estrias no meio ágar tirosina (9.1.15). Após período de incubação de 14 dias em temperatura de 30°C, verificou-se o meio havia mudado sua coloração para uma tonalidade escura (resultado positivo) (Shirling & Gottlieb, 1966).

3.7. Atividade enzimática

Após a realização da metabolização de carbono e nitrogênio dos isolados foi realizada a avaliação da atividade enzimática a qual também contribuiu para a identificação das amostras. Foram testados vários substratos

como amido, carboximetilcelulose, tween 80, gelatina, óleo de oliva, pectina, caseína.

3.7.1. Degradação do amido

Avaliou-se a utilização do amido através da enzima amilase em pH 7 e pH 10. No meio com pH 10 foi acrescentado 5 M de tris fosfato para tamponar o meio. As placas de meio amido (9.1.4) foram divididas em 5 quadrantes onde cada isolado foi inoculado em picada. Após 7 dias de incubação a 37°C, 200µL de lugol foi adicionado sobre as colônias. A formação de uma zona clara em torno da colônia foi considerada positiva para o teste do amido.

3.7.2. Avaliação da atividade celulolítica (carboximetilcelulose)

Os isolados foram inoculados em placas de Petri com meio mínimo de sais (Tuncer et al., 2004) (9.1.16) suplementado com 0,5% de carboximetilcelulose (CMC), e incubados a temperatura de 37°C durante 5 dias. Para a visualização os halos de hidrólise as placas foram coradas com uma solução de vermelho Congo 0,1% e descoradas com uma solução de NaCl 1M.

3.7.3. Avaliação da esterase

Os padrões de actinomicetos foram inoculados em placa de Petri através do método de Haba et al., (2000). O meio (9.1.18) foi suplementado com 0,01% CaCl₂ e Tween 80 o qual foi esterilizado separadamente por 20 minutos a 121°C. Após a esterilização o meio foi esfriado e quando atingida a temperatura de aproximadamente 60°C o Tween 80 foi adicionado a uma

concentração final de 1%. Para a análise dos resultados foi considerado positivo os isolados com halos opacos ao redor das colônias.

3.7.4. Degradação da gelatina

A degradação da gelatina foi avaliada semeando os actinomicetos em tubos de ensaios contendo 2mL de gelatina nutriente (9.1.7). Após 21 dias de incubação a 22°C os tubos foram colocados por 30 minutos na geladeira, após este período foi observado se o meio permanecia líquido (resultado positivo) ou não (resultado negativo).

3.7.5. Atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi detectado em placas de Petri contendo ágar nutriente com uma solução de rodamina B a 0,001% (9.1.17). Após autoclavado, o meio foi esfriado a uma temperatura de 60°C para adição do óleo de oliva numa concentração final de 2,5%. O óleo de oliva foi previamente filtrado em um sistema de membrana 0,22 µm utilizando-se bomba de vácuo. Os isolados foram inoculados em picada, incubados a 37°C por no máximo 14 dias, e as leituras das placas foram realizadas após 5,7e14 dias. Os isolados produtores de lipase apresentavam fluorescência laranja ao redor da colônia ou no interior da mesma quando observados sob radiação UV de 350 nm. Foram utilizados como controle positivo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668 e como controle negativo *Escherichia coli* ATCC 00123.

3.7.6. Atividade pectinolítica

Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meio TSA suplementados com 1% de pectina cítrica (Vetec). As placas foram divididas em 4 quadrantes onde os actinomicetos foram inoculados em uma única estria. Foram incubados a 37°C por no mínimo 7 dias. Para a avaliação da atividade pectinolítica foi utilizado CaCl_2 1M a qual proporcionou a visualização de um halo ao redor das colônias.

3.7.7. Atividade de caseinase

As placas contendo meio caseína para atividade enzimática (9.1.5) foram divididas em seis quadrantes e através de picadas os isolados foram inoculados. Após 14 dias de incubação a 37°C, a formação de uma zona clara ao redor do crescimento indicou o resultado positivo.

3.8. Atividade antimicrobiana dos isolados

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados utilizou-se o método da difusão em placas, através da técnica da dupla camada.

Na difusão em dupla camada os isolados foram inoculados em duplicatas, através de picadas, crescidos em ACA e incubados a 30°C por 14 dias. Após o crescimento verteu-se uma camada de meio de cultura apropriado semeado com uma suspensão de aproximadamente 3×10^8 células/mL (escala de McFarlan) dos microrganismos-alvo. Os meios de cultura utilizados foram ágar Sabouraud (9.1.19) para leveduras e ágar Müeller-Hinton para bactérias, utilizando-se a técnica de “pour plate” do microrganismo testado. O tempo de incubação e a temperatura foram determinados conforme o microrganismo

testado, sendo verificada a formação de halo ao redor dos microrganismos produtores de substâncias bioativas.

3.8.1. Microrganismos testados para atividade biocida

As atividades antimicrobianas foram testadas contra bactérias patogênicas fornecidas pela Fundação Osvaldo Cruz. As linhagens de leveduras foram cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS (Tabela 1).

Tabela 1: Microrganismos patogênicos testados na avaliação da atividade antimicrobiana dos actinomicetos.

Microrganismos	Codificação
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 33018
<i>Candida albicans</i>	ATCC 18804
<i>Criptococcus neoformans</i>	ATCC 3205 A
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 23355
<i>Escherichia coli (LT⁺)</i>	ATCC 00123
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 12530
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 25410
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 12305
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25668
<i>Salmonella enteritidis CT</i>	ATCC 13076
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 00387
<i>Streptococcus mutans (CT)</i>	ATCC 25175
<i>Streptococcus pyogenes grupo A</i>	ATCC 8668
<i>Yersinia enterocolítica</i>	ATCC 9610

* ATCC: American Type Culture Collection

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e identificação morfológica dos actinomicetos

Neste trabalho avaliou-se uma leira de compostagem na qual foram realizadas 10 coletas quinzenais. Destas coletas foram recuperadas a partir do armazenamento em glicerol a 20%, 195 isolados de actinomicetos, os quais foram identificados através das análises morfológicas de microcultivos e provas bioquímicas.

A identificação teve início com a coloração de Gram com o objetivo de verificar a pureza das colônias e a forma predominante como os actinomicetos se apresentavam, ou seja, se os mesmos possuíam formas filamentosas ou se fragmentavam em bacilos, cocos ou cocobacilos. Nesta etapa do trabalho já se pode verificar a diversidade de formas existentes nos grupos de microrganismos, observando-se desde formas totalmente fragmentadas observadas no gênero *Nocardia* até formas filamentosas como no gênero *Streptomyces*.

Após a coloração de Gram foram realizados microcultivos de todas as amostras. A observação das características morfológicas possibilitou a

classificação em nível de gênero. Através da análise destas características observou-se o predomínio dos gêneros *Streptomyces* 66,1% (n=129), *Nocardia* 25,1% (n=49) *Terrabacter* 6,6% (n=13), *Nocardiopsis* 2,5% (n=4).

Os estreptomicetos identificados possuíam micélio aéreo bem desenvolvido e a maioria possuía esporos em cadeias espirais, com alguns apresentando cadeias flexíveis.

A maioria das culturas pertencentes ao gênero *Nocardia* observadas possuíam micélio aéreo e sobre o substrato bastante ramificado e fragmentado. O gênero *Terrabacter* caracterizou-se pela ausência de micélio aéreo e por um micélio sobre o substrato bastante fragmentado, formando bacilos e cocobacilos. O gênero *Nocardiopsis* possuía hifas aéreas formando cadeias longas, ramificadas em zigue-zague.

As características de coloração do micélio aéreo e do micélio sobre o substrato foram utilizadas para auxiliar na identificação dos isolados. Porém estas características foram avaliadas juntamente com as provas bioquímicas para a classificação de uma provável espécie. Os actinomicetos apresentaram cores não muito diversificadas do micélio, principalmente do micélio aéreo, que apresentou cores como: amarelo, branco, cinza, creme e marrom.

4.2. Identificação bioquímica dos actinomicetos

A identificação bioquímica dos isolados foi realizada empregando-se 45 provas bioquímicas, incluindo a coloração de micélio aéreo e sobre o substrato, a produção de enzimas extracelulares, o crescimento dos microrganismos em diferentes concentrações de NaCl e a produção de gás H₂S.

Com as técnicas de identificação da microbiologia clássica, onde provas bioquímicas são utilizadas para a caracterização fisiológica dos microrganismos, foi possível estabelecer um perfil da comunidade de actinomicetos presente na leira de compostagem. As análises dos dados obtidos foram comparados com a Classificação Numérica de *Streptomyces* e gêneros relacionados de Williams et al. (1983a) e Holt et al.(1989). Os isolados foram distribuídos nas famílias de acordo com Williams et al. (1983a) sendo que os dados obtidos foram avaliados em um nível de similaridade de 70% das provas bioquímicas realizadas com relação ao grupo presentes no manual de identificação (Williams et al.,1983a).

A diferenciação dos grupos foi atribuída à coloração da massa de esporos, o substrato micelial, a produção de melanina e a avaliação do crescimento dos microrganismos em diferentes concentrações de NaCl. O critério fisiológico tais como a habilidade de hidrolisar caseína, tirosina, xantina, produção de gás H₂S, utilização da uréia, a produção de enzimas extracelulares foram utilizados para confirmação dos gêneros. As provas para avaliar a utilização de fontes de carbono e nitrogênio tiveram que ser realizadas sobre meio sólido e específico para actinomicetos,sendo que as mesmas foram observadas para uma possível classificação de espécies.

Nos resultados apresentados nas tabelas 2 e 3 observa-se uma pequena variabilidade entre as provas bioquímicas com relação à distribuição dos isolados nas famílias propostas por Williams et al. (1983a).

Na análise da hidrólise de substratos como caseína, tirosina e xantina poucos isolados foram variáveis de acordo com cada família, sendo que 11

isolados não hidrolisaram a caseína, a tirosina apenas 3 isolados pertencentes ao gênero *Terrabacter* não degradaram os grânulos característicos deste substrato e a xantina, 30 isolados foram incapazes de utilizar este substrato, principalmente os pertencentes ao grupo I onde apenas 2 amostras foram positivas e o grupo J onde nenhum dos isolados degradou a xantina (Tabela 2).

De acordo com a coloração do substrato micelial estabelecido pelo Holt et al.(1989) os isolados foram agrupados nos seguintes padrões: cinza 80 isolados, branco 75 isolados, amarelo 25 isolados, marrom 4 isolados bege 1 isolado e 8 isolados apresentaram um crescimento mínimo, o qual não foi possível distinguir uma coloração.

Um outro dado foi à produção de melanina em ágar tirosina, a qual variou em todos os grupos bem como nas padrões de coloração. Esta prova bioquímica determinou a separação de algumas famílias como o grupo A e C onde todos os isolados produziram o pigmento e os grupos B, I e 225 onde nenhuma das amostras apresentou pigmentos melanóides. (Tabela 2).

Uma outra característica avaliada foi o crescimento dos isolados em diferentes concentrações de NaCl (7%,10% e 13%), sendo que na família A e C observou-se o crescimento de todos os isolados nas três concentrações testadas. Nos grupos B e E, os isolados cresceram nas concentrações de 7% e 10%, e o grupo F 8 isolados do grupo J cresceram somente na menor concentração (7%). Nos demais grupos os isolados não cresceram em nenhuma das concentrações de NaCl testadas.

A produção de gás H₂S foi observada pela maioria dos isolados. Cento e setenta dos 195 actinomicetos foram capazes de produzir H₂S. O teste

da redução de nitrato a nitrito mostrou que apenas 10 isolados foram incapazes de reduzi-lo. A uréia foi utilizada por todos os isolados e a esculina foi hidrolisada por 187 isolados, sendo que apenas três isolados pertencentes ao grupo 225, quatro isolados representantes da espécie de *Terrabacter tumescens* e um isolado da família G não apresentaram a hidrólise deste substrato.

A presença da enzima DNAse foi evidenciada em 120 isolados sendo que no grupo H apenas 4 amostras apresentaram a enzima. A produção de enzimas extracelulares foi evidenciada em alguns isolados, porém poucos foram capazes de hidrolisar todos os substratos testados. Este resultado somente foi observado em 3 amostras representando o grupo A e C, 2 do grupo E, 2 do grupo F, 2 do grupo H, 2 *Terrabacter tumescens*, 1 do grupo B, 1 do grupo G.

Nas provas para a verificação da utilização de fontes de carbono, testaram-se três diferentes indicadores de pH em meio sólido e líquido. Os indicadores utilizados foram azul de bromotimol, vermelho de fenol e vermelho neutro, porém os resultados obtidos foram sempre negativos. Este resultado não era o esperado, uma vez que os actinomicetos são conhecidos pela sua capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono. Desta maneira, os testes foram avaliados em meio de cultura líquido rico em sais com os mesmos indicadores de pH citados acima, sendo que diariamente foi determinado o pH das amostras inoculadas. No entanto os resultados foram os mesmos daqueles obtidos em meio sólido.

Desta maneira, os testes foram repetidos sobre meio sólido específico (Holt et al., 1989) e a maioria dos resultados que anteriormente haviam sido negativos, passaram a dar resultados positivos. Nestes meios de culturas a interpretação foi realizada comparando-se o crescimento dos microrganismos nas placas com fonte de carbono a ser testada, controle contendo a glicose (positivo) e sem fonte de carbono (negativo). Os resultados podem ser observados na tabela 3.

Na utilização das várias fontes de carboidratos testados (tabela 3) observou-se que entre os grupos, 25 isolados pertencentes a família A e C foram capazes de utilizar todas as fontes testadas e 6 isolados de coloração branca e 1 de coloração amarela da família E também metabolizaram todas as fontes de carbono. Na análise dos demais padrões com suas respectivas famílias houve uma variabilidade entre os isolados e as fontes de carbono testadas.

Nas provas bioquímicas para avaliar a utilização de diferentes fontes de nitrogênio também utilizou-se o método de comparação dos isolados com os controles positivo e negativo, no entanto, na busca de uma melhor análise dos resultados foi utilizado indicador de pH com objetivo de padronizar as leituras. O indicador utilizado foi o azul de bromotimol e como meio base para a utilização de fontes de nitrogênio contém sais e glicose, fato que auxiliou na produção de ácidos, tornando inicialmente o meio de cor amarela e após uma semana o meio retornou a sua coloração azul indicando a utilização da fonte de nitrogênio. Os resultados de leitura dos 195 isolados testados podem ser observados na tabela 3.

As fontes de nitrogênio apresentaram um perfil muito semelhante entre todos os grupos com exceção da L-cisteína, analisadas nos grupos D, G, H e grupo 225 onde nenhum isolado metabolizou este aminoácido. Na fenilalanina, verificou-se que nos grupos D, G, e H nenhum dos isolados metabolizou esta fonte. A valina nos grupos G e H também apresentou uma característica distinguível nestas famílias, nenhum dos isolados metabolizou esta aminoácido.

A produção de melanina foi observada em meio ágar tirosina, no entanto muitas vezes podia ser observada também em caldo BHI, através do escurecimento do meio.

Na análise de todas as provas bioquímicas os perfis dos isolados foram semelhantes entre si, bem como entre os grupos relacionados, não sendo possível estabelecer com exatidão as espécies dos isolados de actinomicetos. Entre os 195 actinomicetos isolados neste trabalho foram identificados 42 isolados os quais permaneceram nas famílias A e C representadas por espécies do gênero *Streptomyces sp.*, 29 isolados ao grupo H ao qual é caracterizado por *Streptomyces cyanogriseus* e *Streptomyces lateriticus*, 21 isolados na família F a qual é representada por *Streptomyces lavendulae* e *Streptomyces sp.*, 17 isolados pertencentes à família B, representada por *Streptomyces rimosus*, 15 isolados da família J na qual encontra-se *Streptomyces viridoflavus* e isolados acidofílicos, 3 isolados,

Tabela 2: Caracterização bioquímicas baseada na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentrações de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Grupo A/C Cinza	Amido	Arbutina	Caseína	DNA	Esculina	Esterase	Gelatina	H ₂ S	Lipase	L-tirosina	Melanina	NaCl 7%	NaCl 10%	NaCl 13%	Nitrato	Pectina	Uréia	Xantina	Substrato micelial
19M ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
4M ²	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
5M ²	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
32M ³	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
33M ³	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
18M ⁴	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	cinza
25D ⁴	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	cinza
6M ⁵	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
8M ⁵	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
9M ⁵	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	marron
16D ⁵	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
20D ⁵	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	cinza
40D ⁵	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	branco
3D ⁶	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	cinza
19M ⁶	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	cinza
43M ⁶	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	cinza
25M ⁷	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	branco
37D ⁷	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	branco
3M ⁸	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
23M ⁸	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
26D ⁸	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
33M ⁸	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	branco

Tabela 2: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentrações de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Grupo A/C Cinza	Amido	Arbutina	Caseína	DNA	Esculina	Esterase	Gelatina	H ₂ S	Lipase	L-tirosina	Melanina	NaCl 7%	NaCl 10%	NaCl 13%	Nitrato	Pectina	Uréia	Xantina	Substrato micelial
7M ⁹	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
32M ⁹	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	branco
17M ⁹	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	cinza
18M ⁹	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
25M ⁹	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
2M ¹⁰	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	amarelo
4M ¹⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
8M ¹⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
9M ¹⁰	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
11M ¹⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
14M ¹⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
Branco																			
8D ²	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
30M ³	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	branco
22M ⁴	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	branco
31M ⁷	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	branco
36D ⁷	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
Amarelo																			
4M ⁸	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	cinza
4D ⁸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	cinza
8D ⁸	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	cinza
Marrom																			
23M ⁹	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	branco

Tabela 2: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentrações de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Grupo B Branco	Amido	Arbutina	Caseína	DNA	Esculina	Esterase	Gelatina	H ₂ S	Lipase	L-tirosina	Melanina	NaCl 7%	NaCl 10%	NaCl 13%	Nitrato	Pectina	Uréia	Xantina	Substrato micelial
8M ²	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	cinza
6M ³	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	branco
34D ⁵	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	branco
23M ⁶	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	cinza
38D ⁶	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	cinza
20M ⁷	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	branco
19D ⁸	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	cinza
22D ⁸	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	cinza
38D ⁸	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	cinza
38M ⁸	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	cinza
5D ⁹	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	amarelo
30M ⁹	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	branco
36D ⁹	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	branco
36M ⁹	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	branco
Amarelo																			
9D ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	cinza
3M ³	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	amarelo
35D ¹⁰	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	cinza
Grupo E Branco																			
3M ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	cinza
2M ³	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	amarelo

Tabela 2: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentrações de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Grupo E Branco	Amido	Arbutina	Caseína	DNA	Esculina	Esterase	Gelatina	H ₂ S	Lipase	L-tirosina	Melanina	NaCl 7%	NaCl 10%	NaCl 13%	Nitrato	Pectina	Uréia	Xantina	Substrato micelial
13M ³	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	branco
19M ³	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	Branco
24D ³	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	Amarelo
4M ⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	Amarelo
12D ⁵	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	Branco
26M ⁵	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	Bege
38D ⁵	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Cinza
3D ⁸	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Cinza
7D ⁹	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	Cinza
31M ⁹	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Cinza
22D ¹⁰	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Cinza
Amarelo																			
23M ³	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	Amarelo
25D ⁸	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	Cinza
35D ⁸	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	Amarelo
12M ⁹	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Cinza
16M ⁹	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Cinza
Grupo F Cinza																			
7D ²	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	Cinza
11D ²	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	Cinza
1D ⁵	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Cinza
7M ⁵	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Cinza

Tabela 2: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentrações de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Grupo F Cinza	Amido	Arbutina	Caseína	DNA	Esculina	Esterase	Gelatina	H ₂ S	Lipase	L-tirosina	Melanina	NaCl 7%	NaCl 10%	NaCl 13%	Nitrato	Pectina	Uréia	Xantina	Substrato micelial
18M ⁵	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Branco
28M ⁵	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Branco
2D ⁶	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Cinza
10D ⁶	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Cinza
13D ⁶	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	Branco
26M ⁶	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Branco
32D ⁶	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	Cinza
25D ⁷	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	Branco
27D ⁷	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Cinza
24D ⁸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Branco
10D ⁹	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Branco
24M ⁹	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	Amarelo
32D ⁹	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	Branco
40D ⁹	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Cinza
13D ¹⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Cinza
Branco																			
28M ³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	Branco
34M ³	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	Branco
Grupo J Cinza																			
11M ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Cinza
21M ⁵	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Cinza

Tabela 2: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentrações de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Grupo J Cinza	Amido	Arbutina	Caseína	DNA	Esculina	Esterase	Gelatina	H ₂ S	Lipase	L-tirosina	Melanina	NaCl 7%	NaCl 10%	NaCl 13%	Nitrato	Pectina	Uréia	Xantina	Substrato micelial
22M ⁵	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Cinza
30D ⁵	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Branco
30M ⁵	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Branco
21M ⁷	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Branco
26M ⁹	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	Branco
7D ¹⁰	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Branco
29D ¹⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Branco
29M ¹⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Branco
Branco																			
44D ³	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Marrom
20D ⁸	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Cinza
38M ⁸	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Branco
Amarelo																			
20D ⁷	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Branco
37D ⁹	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Amarelo
Grupo D																			
Branco																			
42M ⁶	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Cinza
3D ⁹	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	Branco
39D ⁹	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Branco
Grupo G																			
Branco																			
6D ⁷	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Amarelo
6M ¹⁰	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco

Tabela 2: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentrações de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro

Grupo H Amarelo	Amido	Arbutina	Caseína	DNA	Esculina	Esterase	Gelatina	H ₂ S	Lipase	L-tirosina	Melanina	NaCl 7%	NaCl 10%	NaCl 13%	Nitrato	Pectina	Uréia	Xantina	Substrato micelial
3D ³	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Amarelo
12M ³	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Amarelo
13D ³	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Amarelo
12D ⁴	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Amarelo
12M ⁴	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Amarelo
Branco																			
17M ³	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Amarelo
21M ³	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
22D ³	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco
27M ³	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
31M ³	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
Cinza																			
8M ⁴	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Branco
10D ⁵	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Cinza
22D ⁶	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco
22D ⁷	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Branco
28D ⁷	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Cinza
33M ⁷	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Amarelo
40D ⁷	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
9D ⁸	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Cinza
28D ⁸	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Marrom
29D ⁸	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Marrom
31D ⁸	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Branco
32D ⁸	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco

Tabela 2: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentrações de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro

Grupo H Cinza	Amido	Arbutina	Caseína	DNA	Esculina	Esterase	Gelatina	H ₂ S	Lipase	L-tirosina	Melanina	NaCl 7%	NaCl 10%	NaCl 13%	Nitrato	Pectina	Uréia	Xantina	Substrato micelial
1D ⁹	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Amarelo
22D ⁹	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
22M ⁹	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
33M ⁹	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Branco
20D ¹⁰	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
28M ¹⁰	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
30D ¹⁰	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Amarelo
Grupo I Cinza																			
31D ¹⁰	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
38D ¹⁰	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
6M ²	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Cinza
10M ²	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Cinza
4D ⁶	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	Cinza
12D ⁶	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	Cinza
28D ⁶	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	Cinza
35D ⁶	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	Cinza
36D ⁶	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	Cinza
9M ⁹	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	Branco
33D ⁹	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Branco
35D ⁹	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Branco

Tabela 2: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentrações de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro

Grupo 225 Branco	Amido	Arbutina	Caseína	DNA	Esculina	Esterase	Gelatina	H ₂ S	Lipase	L-tirosina	Melanina	NaCl 7%	NaCl 10%	NaCl 13%	Nitrato	Pectina	Uréia	Xantina	Substrato micelial
11M ³	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Branco
15M ³	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Amarelo
24M ³	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
26M ³	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
Cinza																			
23M ⁵	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Amarelo
17D ⁸	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Cinza
33D ⁸	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
34D ⁸	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Cinza
40D ⁸	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Cinza
7D ⁴	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Cinza
33D ⁵	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco
37D ⁵	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco
21D ⁷	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Amarelo
1D ⁸	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco
14D ⁸	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Cinza
29M ⁸	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco
1M ¹⁰	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Amarelo
36D ¹⁰	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco
Bege																			
1M ⁵	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Branco

Tabela 2: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na degradação de substratos, crescimento em diferentes concentrações de sais e produção de pigmentos das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro

Outros Grupos	Amido	Arbutina	Caseína	DNA	Esculina	Esterase	Gelatina	H ₂ S	Lipase	L-tirosina	Melanina	NaCl 7%	NaCl 10%	NaCl 13%	Nitrato	Pectina	Uréia	Xantina	Substrato micelial
15M ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	S/Pig
17M ¹	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	Amarelo
1D ³	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	S/Pig
24M ⁵	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	S/Pig
28M ⁶	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	Amarelo
41M ⁶	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	S/Pig
16D ⁷	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	S/Pig
22M ⁷	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	Branco
26D ⁷	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	Branco
30D ⁷	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	Amarelo
30M ⁷	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Branco
11D ⁸	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	S/Pig
27D ⁸	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	Branco
5M ⁹	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	S/Pig
6M ⁹	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Branco
32D ⁹	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	S/Pig
4D ¹⁰	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Cinza

Nº sobrescrito corresponde à identificação das coletas

M= coleta da leira Mista

D= Coleta da leira Doméstica

Tabela 3: Caracterização bioquímicas baseada na utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Cinza Grupo A/C	19M ¹	4M ²	5M ²	18M ⁴	32M ³	33M ³	25D ⁴	6M ⁵	8M ⁵	9M ⁵	16D ⁵	20D ⁵	40D ⁵	3D ⁶	19M ⁶	43M ⁶	25M ⁷	37D ⁷	3M ⁸	23M ⁸	26D ⁸	33M ⁸	7M ⁹	
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato Sodio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-melecitose	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cisteina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Histidina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KNO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-metionina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Treonina	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-

Tabela 3: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Cinza Grupo A/C	17M ⁹	18M ⁹	25M ⁹	32M ⁹	2M ¹⁰	4M ¹⁰	8M ¹⁰	9M ¹⁰	11M ¹⁰	14M ¹⁰	Branco Grupo A/C	8D ²	30M ³	22M ⁴	31M ⁷	36D ⁷	marrom Grupo A/C	23M ⁹	Amarelo Grupo A/C	4M ⁸	4D ⁸	8D ⁸
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
Citrato Sodio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
D-frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
D-manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
D-melecitose	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	-	+		+		-	-	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		-		+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
Rafinose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		-		+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	-	+	-	-		+		+	+	+
Cisteina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	+	-	+	+		-		+	+	+
Fenilalanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	-	+	+	-		+		+	+	+
Histidina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		-		+	+	+
KNO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
L-metionina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		-	-	+
Serina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
Treonina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+
Valina	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-		+	-	+	+	+		-		-	-	-

Tabela 3: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Branco Grupo B	8M ²	6M ³	34D ⁵	23M ⁶	38D ⁶	20M ⁷	19D ⁸	22D ⁸	38D ⁸	38M ⁸	5D ⁹	30M ⁹	36D ⁹	36M ⁹	Amarelo Grupo B	9D ²	3M ³	35D ¹⁰	Branco Grupo E	3M ¹	2M ³	13M ³	19M ³
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
Citrato Sodio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
D-frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	-	+	+
D-manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
D-melecitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
L-ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-		+	-	+	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		-	+	+		-	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+		+	-	+		+	-	-	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-		+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		+	-	+		+	+	-	+
Arginina	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	-	+	+
Cisteina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		-	+	-		+	+	-	-
Fenilalanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+		+	-	+		+	+	+	+
Histidina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
KNO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
L-metionina	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-		+	+	+		-	+	+	+
Serina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
Treonina	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	+		+	+	+	-
Valina	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-		+	+	+		+	+	+	+

Tabela 3: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Cinza Grupo H	8M ⁴	10D ⁵	22D ⁶	22D ⁷	28D ⁷	33M ⁷	40D ⁷	9D ⁸	28D ⁸	29D ⁸	31D ⁸	32D ⁸	1D ⁹	22D ⁹	22M ⁹	33M ⁹	20D ¹⁰	28M ¹⁰	30D ¹⁰	Branco Grupo I	31D ¹⁰	38D ¹⁰	6M ²
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Citrato Sodio	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-		+	+	+
D-frutose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+	+	+
D-galactose	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+		-	-	+
D-manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
D-melecitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Lactose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-		-	-	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
L-ramnose	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	+	+
M-inositol	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+		+	+	+
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+	+	+
Salicina	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-		-	-	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+		+	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+		-	-	+
Cisteina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+	-	-
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Histidina	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
KNO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
L-metionina	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-		-	-	+
Serina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Treonina	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Valina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+	+	+

Tabela 3: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Branco Grupo I	10M ²	4D ⁶	12D ⁶	28D ⁶	35D ⁶	36D ⁶	9M ⁹	33D ⁹	35D ⁹	Branco Grupo 225	11M ³	15M ³	24M ³	26M ³	Cinza Grupo 225	23M ⁵	17D ⁸	33D ⁸	34D ⁸	40D ⁸	7D ⁴	33D ⁵	37D ⁵
Celbiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato Sodio	-	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	+	+		-	+	+	+	-	-	+	+
D-frutose	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		-	+	+	+	+	+	+	+
D-manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
D-melecitose	-	-	-	+	-	-	+	+	-		-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	+	+	+	+	+	+	+		-	+	-	-		-	+	+	+	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	-	-	-	+	+	+	+	-	-		-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	-	+	+	-	+	+		-	+	-	-		-	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	-	-	-	+	+	+	+	+	+		-	-	-	-		+	-	-	-	+	-	-	-
Salicina	+	-	-	-	+	+	+	-	-		+	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	+	+	+	-	-	+	-	+		-	-	-	-		-	-	-	-	-	+	-	-
Trealose	+	-	+	+	+	+	+	-	+		-	-	+	+		+	-	+	-	+	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	-	+	+	-		+	-	+	+		+	+	+	+	-	-	-	-
Cisteina	+	-	-	-	+	-	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
Fenilalanina	+	-	-	-	-	+	+	+	-		+	-	-	-		+	+	-	+	+	+	+	+
Histidina	+	+	+	+	+	+	+	+	-		-	+	+	+		-	+	+	+	+	+	+	+
KNO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
L-metionina	+	+	+	+	+	+	-	+	-		-	+	-	-		-	+	-	+	+	+	+	+
Serina	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Treonina	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Valina	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	-	-	-		+	+	+	+	+	-	+	+

Tabela 3: (continuação) Caracterização bioquímicas baseada na utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio das amostras isoladas de processo de compostagem da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro.

Cinza Grupo 225	21D ⁷	1D ⁸	14D ⁸	29M ⁸	1M ¹⁰	36D ¹⁰	Bege Grupo 225	1M ⁵	S/Color Outros Grupos	15M ¹	17M ¹	1D ³	24M ⁵	28M ⁶	41M ⁶	16D ⁷	22M ⁷	26D ⁷	30D ⁷	30M ⁷	11D ⁸	27D ⁸	5M ⁹	6M ⁹	38D ⁹	4D ¹⁰
Celobiose	+	+	+	+	+	+		+		-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Citrato Sodio	-	-	-	-	-	+		+		-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
D-frutose	-	-	-	-	-	-		-		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+	-		+		+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
D-manose	+	+	+	+	+	+		+		-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
D-melecitose	-	-	-	-	-	-		-		-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
D-xilose	+	+	+	+	+	+		+		-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-		-		-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
L-arabinose	+	+	+	+	+	+		+		+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	-	-	+	-	-		-		-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+		+		-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+		-		+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
Rafinose	+	+	+	+	-	-		-		-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Salicina	-	-	-	-	-	-		+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-		-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Trealose	-	-	-	-	-	-		-		+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	-		+		+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Cisteina	-	-	-	-	-	-		-		+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Fenilalanina	+	-	-	-	-	-		+		-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
Histidina	+	+	+	+	+	+		-		-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
KNO ₃	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-metionina	-	+	+	+	-	+		+		-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Serina	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Treonina	+	+	+	+	-	+		+		+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Valina	-	-	+	+	+	+		-		-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-

3 isolados ficaram na família D representadas por *Streptomyces violaceal* e *Streptomyces massasporeus*, 2 representantes da família G caracterizado por *Streptomyces fradiae*. Os demais isolados foram distribuídos Grupo 225 com 19 representantes de *Nocardia capreola*, o grupo E com 18 isolados representados por *Nocardia mediterranea* e *Actinomadura sp.* e o grupo I (n=12) representado por *Nocardia sp.* Dentre as análises foram identificados 13 isolados de *Terrabacter tumescens* e 4 *Nocardiopsis sp.* (Tabela 2,3,4).

Tabela 4: Distribuição dos isolados identificados nos deferentes grupos de actinomicetos segundo em Williams et al. (1983a).

Grupos	Representantes	Nº de isolados
Grupo A e C	Varias espécies de <i>Streptomyces</i>	42 isolados
Grupo B	<i>Streptomyces rimosus</i>	17 isolados
Grupo E	<i>Nocardia mediterranea</i> e <i>Actinomadura sp.</i>	18 isolados
Grupo F	<i>Streptomyces lavendulae</i> e <i>Streptomyces</i>	21 Isolados
Grupo J	<i>Streptomyces viridoflavus/acidofílicos</i>	15 isolados
Grupo D	<i>Streptomyces violacea</i> e <i>Streptomyces massasporeus</i>	3 isolados
Grupo G	<i>Streptomyces fradiae</i>	2 isolados
Grupo H	<i>Streptomyces cyanogriseus</i> e <i>Streptomyces lateriticus</i>	29 isolados
Grupo I	<i>Nocardia sp.</i>	12 isolados
Grupo 225	<i>Nocardia capreola</i>	19 isolados
<i>Nocardiopsis sp.</i>	<i>Nocardiopsis sp.</i>	4 isolados
<i>Terrabacter sp.</i>	<i>Terrabacter tumescens</i>	13 isolados
Total	-	195 isolados

4.3 Avaliação da atividade biocida dos actinomicetos isolados do processo de compostagem

Na avaliação da atividade antimicrobiana, áreas de inibição aparecem como zonas claras ao redor das colônias produtoras de metabólitos (figura 1). Dos 195 actinomicetos testados 93 (47,6%) amostras produziram substâncias inibitórias contra alguns dos microrganismos testados, destes 29 isolados (31,1%) inibiram mais de um microrganismo de relevância clínica.



FIGURA 1: Áreas de inibição produzidas por isolado pertencente ao gênero *Streptomyces* contra *Yersinia enterocolítica* (seta indica halo de inibição).

Dentre os actinomicetos produtores de substâncias biocidas a maioria deles inibiram bactérias Gram-positivas como mostra a tabela 5. Sendo que as bactérias patogênicas inibidas mais vezes foram *Streptococcus pyogenes* (n=29), *Staphylococcus aureus* (n=26) e *Bacillus cereus* (n=22). Entre as espécies Gram-positivas testadas o *Micrococcus luteus* foi o menos

inibido pelos actinomicetos avaliados, apenas 6 amostras produziram metabólitos com ação contra *Micrococcus luteus*. Quanto às bactérias Gram-negativas apenas *Yersinia enterocolitica* foi inibida por 3 isolados de actinomicetos. Na avaliação dos isolados contra as leveduras testadas 15 actinomicetos foram capazes de inibir *Candida albicans*, principalmente os representantes das famílias B, Grupo 225, grupo H. Já *Cryptococcus neoformans* foi inibido somente por 5 isolados de actinomicetos, os quais são representantes das famílias H (n=3), J (n=1) e A e C (n=1).

Dentre os gêneros produtores de metabólitos bioativos ressaltamos o gênero *Streptomyces* que representou 70% dos isolados produtores de compostos bioativos, seguidos de *Nocardia* com 20% e *Terrabacter* com 8% conforme observar-se na tabela 5.

Na avaliação dos grupos de actinomicetos com atividade biocida contra bactérias Gram-positivas, destacamos o grupo H, onde os isolados produziram compostos bioativos contra todas as bactérias Gram-positivas testadas (Tabela 6). Cabe ressaltar ainda que dentro dos diferentes grupos foi possível observar isolados com atividade em mais de um microrganismo patogênico. No Grupo A e C um isolado foi capaz de inibir *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, o grupo 225 onde um dos isolados inibiu *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (Figura 2). O grupo F apresentou um isolado com capacidade de inibir *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus mutans* e o grupo H o

qual um dos isolados inibiu *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Criptococcus neoformans* e *Streptococcus pyogenes* (Figura 3).

Na avaliação da atividade biocida contra bactérias Gram-negativas destacamos os grupos B, E e F os quais inibiram pelo menos uma das bactérias Gram-negativas testadas. O grupo H foi o que apresentou a melhor atividade contra bactérias Gram-negativas inibindo *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*. O gênero *Terrabacter* foi ativo contra *Enterobacter cloacae* (Tabela 7). Os resultados mostram a capacidade dos actinomicetos na produção de compostos bioativos naturais.

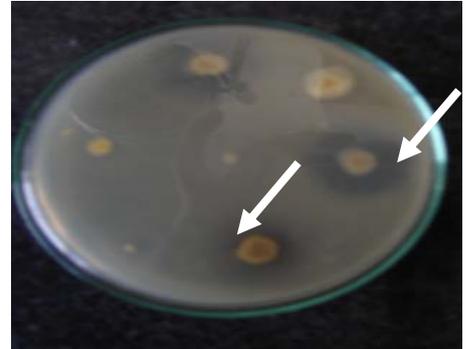
Na avaliação da atividade antifúngica verificou-se que os grupo 225 (n=3), Grupo B (n=3), e o gênero *Terrabacter* foram os melhores produtores de metabólitos bioativos contra *Candida albicans* e isolados pertencentes aos grupos H (n=2) e do Grupo A-C (n=2) foram ativos contra *Criptococcus neoformans*.

Para melhor avaliar as condições de produção de metabólitos foram testados diferentes temperaturas e períodos de incubação: 37°C e 30°C e 7,10 e 14 dias. Os parâmetros ideais para a produção foram a temperatura de 30°C e incubação de 14 dias nos quais os isolados produziram mais compostos bioativos e zonas de inibição maiores.

(a)



(b)



(c)



Figura 2: Halo de inibição demonstrando a atividade biocida de um isolado do grupo 225 contra (a) *Staphylococcus aureus* (b) *Streptococcus pyogenes*, (c) *Bacillus cereus*

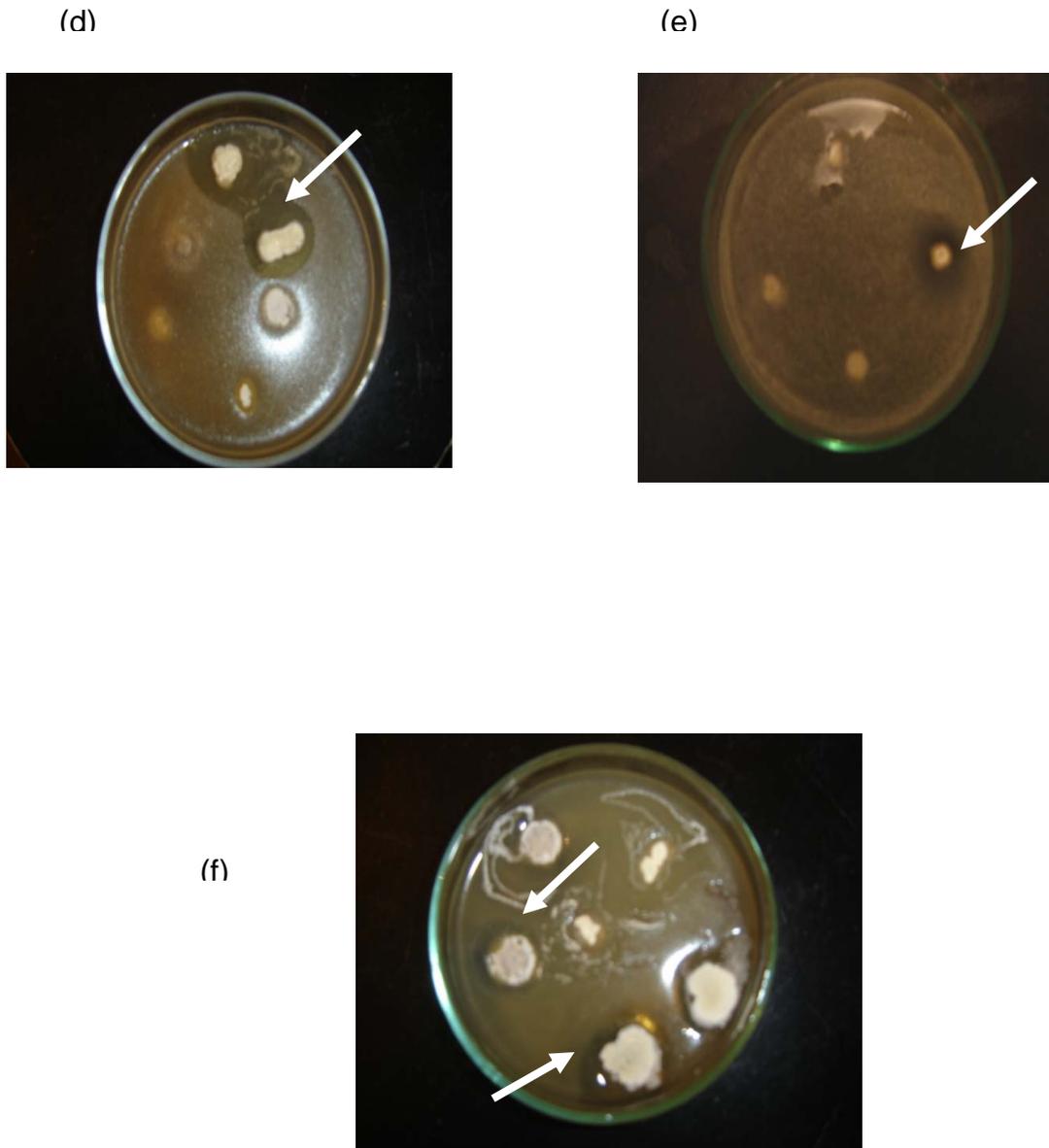


Figura 3: Halo de inibição demonstrando atividade biocida de um isolado do Grupo H contra (d) *Criptococcus neoformans*, (e) *Candida albicans* e (f) *Streptococcus pyogenes*.

Tabela 5: Distribuição dos gêneros produtores de compostos biocidas testados contra bactérias e fungos de importância clínica

Controles ATCC	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Nocardia</i> sp.	<i>Terrabacter</i> sp.	<i>Nocardioopsis</i> sp.
<i>Bacillus cereus</i> 33018	15	7	-	-
<i>Candida albicans</i> 18804	8	5	2	-
<i>Criptococcus neoformans</i> 3205	5	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> 23355	1	-	1	-
<i>Eschericia coli</i> 00123	2	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 12530	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> 25410	14	2	1	-
<i>Micrococcus luteus</i> 12305	4	-	2	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 25668	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	1	1	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i> 13313	1	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 00387	20	4	2	-
<i>Streptococcus mutans</i> 25175	9	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> 8668	19	7	3	-

<i>Yersinia enterocolitica</i> 9610	2	1	-	-
-------------------------------------	---	---	---	---

ATCC: American Type Culture Collection

Tabela 6: Distribuição da atividade antimicrobiana dos grupos, representados em números absolutos contra bactérias Gram-positivas.

Grupos de actinomiceto	Gêneros	Bactérias testadas					
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Grupo A-C	<i>Streptomyces</i>	2	2	-	7	3	9
Grupo B	<i>Streptomyces</i>	3	3	1	3	-	2
Grupo E	<i>Nocardia</i>	3	-	-	-	-	4
Grupo F	<i>Streptomyces</i>	2	4	-	3	2	2
Grupo J	<i>Streptomyces</i>	1	3	-	2	1	1
Grupo D	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	1	-	1
Grupo G	<i>Streptomyces</i>	1	1	-	-	1	-
Grupo H	<i>Streptomyces</i>	6	1	3	4	2	4
Grupo I	<i>Nocardia</i>	-	1	-	1	-	1
Grupo 225	<i>Nocardia</i>	4	1	-	3	-	2
<i>Nocadiopsis</i>	<i>Nocadiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Terrabacter</i>	<i>Terrabacter</i>	-	1	2	2	-	3
Total		22	17	6	26	9	29

Tabela 7: Distribuição da atividade antimicrobiana dos grupos, representados em números absolutos contra bactérias Gram-negativas.

Grupos de actinomiceto	Gêneros	Microrganismos testados				
		<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Yersinia enterocolítica</i>
Grupo A-C	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	-	-
Grupo B	<i>Streptomyces</i>	1	-	1	-	-
Grupo E	<i>Nocardia</i>	-	-	1	-	1
Grupo F	<i>Streptomyces</i>	-	1	-	1	-
Grupo J	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	-	-
Grupo D	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	-	-
Grupo G	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	-	-
Grupo H	<i>Streptomyces</i>	-	1	-	-	2
Grupo I	<i>Nocardia</i>	-	-	-	-	-
Grupo 225	<i>Nocardia</i>	-	-	-	-	-
<i>Nocadiopsis</i>	<i>Nocadiopsis</i>	-	-	-	-	-
<i>Terrabacter</i>	<i>Terrabacter</i>	1	-	-	-	-
Total		2	2	2	1	3

4.5 Avaliação da atividade enzimática dos actinomicetos

Os diferentes substratos foram utilizados para avaliar a atividade enzimática dos isolados. Observou-se que todos os isolados apresentaram atividade sobre alguns dos substratos testados. O gênero *Streptomyces* foi a que apresentou o maior número de isolados com atividade enzimática. Apenas nos meios com gelatina, pectina e óleo de oliva houve um menor número de isolados com as enzimas correspondentes.

O gênero *Nocardia* evidenciou alta atividade com relação à amilase, pois 100% dos isolados hidrolisaram o amido; além disso a caseinase ocorreu em 95% dos isolados deste gênero.

O perfil enzimático dos isolados entre os grupos foi muito semelhante, porque nos substratos como o amido, a caseína e a carboximetilcelulose foram hidrolisados pela absoluta maioria dos isolados (Tabela 9).

As enzimas com mais baixo índice de atividade entre os diferentes grupos identificados neste trabalho foram a lipase, gelatinase e pectinase. A pectina foi o substrato menos hidrolisado entre os grupos.

Entre os grupos melhores produtores de enzimas extracelulares destacamos os grupos A e C, B, F, H, I, E e o gênero *Terrabacter*, os quais apresentaram isolados capazes de hidrolisar todos os substratos avaliados (Tabela 9).

TABELA 8: Porcentagem dos diferentes gêneros de actinomicetos que apresentaram atividade enzimática utilizando diferentes substratos.

Gêneros	Enzimas avaliadas							
	Amilase	Amilase	Caseinase	Celulase	Esterases	Gelatinase	Lipase	Pectinase
	pH 7	pH10						
<i>Streptomyces</i>	94%	98%	94%	93%	93%	45%	51%	21%
<i>Nocardiopsis</i>	100%	100%	50%	50%	50%	-	-	-
<i>Nocardia</i>	100%	100%	95%	85%	75%	34%	24%	38%
<i>Terrabacter</i>	100%	100%	100%	100%	100%	53%	53%	30%
Números de isolados	188 (96%)	193 (98%)	184 (94%)	178 (91%)	172 (88%)	79 (40%)	86 (44%)	51 (26%)

Tabela 9: Perfil enzimático de cada grupo de actinomicetos identificados mais os gêneros *Terrabacter* e *Nocardiopsis* representado em números percentuais.

Grupos	Gêneros	Enzimas avaliadas							
		Amilase pH 7	Amilase pH 10	Caseinase	Celulase	Esterase	Gelatinase	Lipase	Pectinase
Grupo A-C	<i>Streptomyces</i>	92%	97%	95%	97%	88%	33%	47%	26%
Grupo B	<i>Streptomyces</i>	100%	100%	94%	82%	94%	41%	47%	11%
Grupo E	<i>Nocardia</i>	100%	100%	100%	72%	83%	22%	38%	44%
Grupo F	<i>Streptomyces</i>	95%	100%	85%	100%	90%	52%	66%	42%
Grupo J	<i>Streptomyces</i>	93%	100%	100%	93%	93%	46%	73%	-
Grupo D	<i>Streptomyces</i>	100%	100%	100%	100%	100%	66%	-	33%
Grupo G	<i>Streptomyces</i>	100%	100%	100%	100%	100%	50%	50%	-
Grupo H	<i>Streptomyces</i>	93%	96%	96%	86%	100%	44%	41%	17%
Grupo I	<i>Nocardia</i>	100%	100%	83%	91%	83%	33%	25%	50%
Grupo 225	<i>Nocardia</i>	100%	100%	100%	94%	63%	47%	10%	26%
<i>Nocardiopsis</i>	<i>Nocardiopsis</i>	100%	100%	50%	50%	50%	50%	-	-
<i>Terrabacter</i>	<i>Terrabacter</i>	100%	100%	100%	100%	100%	38%	53%	30%
Total de isolados ativos		96%	98%	94%	91%	88%	40%	44%	26%

5. DISCUSSÃO

5.1 Identificação bioquímica dos isolados

A coloração de Gram, uma das primeiras etapas na identificação dos actinomicetos permite observar à grande variedade de formas neste grupo de microrganismos. Esta ampla variedade morfológica já havia sido verificada por Connell (2001), que em seu trabalho considerou os actinomicetos um grupo de microrganismos com características morfológicas diversificadas, compreendendo bactérias que se dividem por fissão binária, tais como *Corynebacterium*, espécies com envelope celular e ramificações como *Mycobacterium* e *Nocardia*, até espécies amplamente ramificadas e filamentosas como os *Streptomyces*.

Com a análise dos microcultivos dos isolados foi possível a observação de várias características morfológicas tais como: ramificação do micélio ao nível de substrato, do micélio aéreo, fragmentação ou produção de esporos, sendo que os gêneros *Streptomyces* e *Nocardia* foram predominantes no presente trabalho. Segundo outros autores há predominância do gênero *Streptomyces* em processos de compostagem (McCarthy & Williams, 1990;

Oliveira, 2002; Tuomela et al., 2000). Resultados semelhantes foram encontrados por Lacey (1997) em seu trabalho com actinomicetos em leiras de compostagem. O autor observou que os gêneros predominantes foram *Streptomyces* e *Nocardia*, seguidos por *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora* e *Micromonospora*. A alta incidência de *Streptomyces* pode estar relacionada com o fato deste microrganismo ter crescimento mais rápido do que os demais actinomicetos. Segundo Araújo (2000) a maioria dos actinomicetos tem ciclo celular de 2 a 3 dias, enquanto em que *Streptomyces* é de 1,7 dias. Além disto os *Streptomyces* produzem compostos que controlam o crescimento de outras bactérias e fungos o que os torna melhores competidores (Suutari et al., 2002).

Taiwo e Oso (2004) estudando a diversidade de populações microbianas durante a compostagem, isolaram e identificaram várias bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* foram encontradas durante a fase mesofílica e de maturação. Por outro lado o gênero *Nocardia* freqüentemente aparece devido à sua ampla distribuição no ambiente. O gênero *Terrabacter* é pouco citado como um gênero predominante ou freqüente durante o processo de compostagem. Este fato pode estar associado ao material presente na leira, pois a diversidade das populações microbianas geralmente é influenciada pelo tipo de material a ser decomposto. Além disso, este fato pode ser um reflexo da falta de trabalhos publicados na área, pois muitos microrganismos presentes durante o processo de compostagem ainda não foram cultivados e identificados.

A dificuldade no processo de identificação dos actinomicetos é devido à variabilidade na caracterização dos testes que envolvem vários fatores como: a quantidade de inóculo, a temperatura de incubação, o período de incubação, bem como os critérios usados para avaliar os resultados positivos e negativos, uma vez que em vários testes pode-se considerar os critérios bastante subjetivos.

No presente trabalho a identificação dos isolados foi determinada pela comparação das características morfológicas e bioquímicas dos isolados, os quais foram agrupados nas famílias de acordo com Williams et al.(1983a). A identificação entre os isolados ao nível de espécie foi dificultada devido à similaridade das características bioquímicas das amostras com relação aos grupos propostos por Williams et al.(1983a). Algumas provas bioquímicas foram determinantes na separação dos grupos tais como a produção de melanina, a concentração de NaCl e a produção de gás H₂S. Entretanto em relação às espécies estas provas não determinam uma distinção precisa entre os isolados, sendo assim necessário outras provas bioquímicas como a resistência a vários antibióticos, o crescimento dos microrganismos em diferentes temperaturas, a avaliação da produção de pigmentos sensíveis ao pH, entre outras. Um outro fator limitante no processo de identificação é o tempo de crescimento dos isolados em determinados meios de cultura, bem como a sensibilidade destes frente a faixas de pH restringindo a determinação de algumas espécies.

Um outro fator que foi pouco evidenciado em nosso trabalho foi à coloração da massa de esporos, a qual não variou significativamente entre os

isolados sendo que na maioria deles a coloração predominante foi o cinza e o branco, cores que são amplamente evidenciadas na maioria das famílias de actinomicetos. Um fator que deve ser levado em consideração quanto à coloração do micélio aéreo dos grupos de actinomicetos é o meio de cultura utilizado (Holt et al., 1989). Muitos actinomicetos crescem em meios de cultura comuns usados na rotina no laboratório, porém outros requerem meios de cultura especiais para a diferenciação dos esporos e a produção de pigmentos, bem como as condições de incubação, temperatura e a faixa de pH utilizada neste processo.

Com base nas características avaliadas no processo de identificação de espécies várias chaves são construídas porém poucas espécies são distinguidas (Dietz, 1986).

Taddei et al. (2005) trabalhando com o isolamento e a identificação de actinomicetos oriundos de solo analisaram várias provas bioquímicas de 71 isolados de *Streptomyces*, os quais demonstraram uma taxonomia entre si bastante semelhante, de forma que estes poderiam ser agrupados em um mesmo grupo. Um outro fator relevante no trabalho de Taddei et al.(2005) foi a análise comparativa usando software “Minitab” que apresentou que dos 71 isolados 67 são presumivelmente padrões novos de actinomicetos pois estes apresentaram uma menor similaridade com outras espécies reportadas, sendo que apenas quatros isolados foram 100% idênticos com uma, duas ou três espécies de *Streptomyces*.

O microcultivo utilizado para a diferenciação dos isolados torna-se uma ferramenta essencial no processo de identificação entre os actinomicetos, uma

vez que esta técnica possibilita a visualização de algumas estruturas reprodutivas dos isolados, a presença ou ausência dos esporos, a distribuição e análise da superfície das estruturas reprodutivas, contribuindo assim para a distinção entre os gêneros. A técnica do microcultivo descrita por Stanley et al. (1989) possibilitou a observação de várias características morfológicas. Entre os vários trabalhos realizados no isolamento e identificação de actinomicetos, muitos destes estão reportando o surgimento de espécies novas nas quais as características fisiológicas, morfológicas e genéticas são avaliadas para a determinação de novas espécies (Taddei et al., 2005; Groth et al., 2003; Xu et al., 1998; Li et al., 2002; Al-Tai et al., 1999). Os métodos moleculares, notavelmente a análise filogenética da região 16S rDNA, tem aumentado com relação à sistemática de *Streptomyces* (Kim et al., 1998; Embley & Stackebrandt, 1994; Mehling et al., 1995). A análise genética juntamente com avaliação das características morfológicas e bioquímicas pode proporcionar informações úteis e reduzir assim o risco de classificação incorreta.

Os métodos para uma rápida e precisa identificação de actinomicetos incluem a análise da composição de ácidos graxos por cromatografia, como sugerida por Drucker, (1981), ou a análise de DNA (Anzai et al., 1994). A identificação dos actinomicetos é baseada em caracterizações bioquímicas e moleculares como realizado por Valenzuela et al. (2005) onde eles identificaram 12 isolados de *Nocardia asteroides* por técnica de PCR-RFLP e provas bioquímicas. A identificação de *Nocardia* tem sido tradicionalmente baseada na caracterização morfológica e testes bioquímicos (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Mishra et al., 1980). As técnicas de biologia

molecular como PCR-RFLP em combinação com os testes bioquímicos convencionais permitem uma caracterização mais precisa das espécies conhecidas. Métodos tradicionais para a identificação de actinomicetos são lentos e muitos possuem elevados custos, assim os enfoques em biologia molecular na identificação são principalmente usados pela sua velocidade e eficiência, mas mesmo assim os testes bioquímicos e morfológicos não podem ser descartados, mas possivelmente diminuídos.

5.2 Atividade antimicrobiana

A busca por novos metabólitos, principalmente antibióticos efetivos contra bactérias patogênicas multiresistentes é constante. Vários microrganismos são capazes de produzir substâncias bioativas como espécies de *Bacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*.

A produção de metabólitos foi evidenciada neste trabalho, em 47,6% (93 dos isolados) das amostras, as quais produziram substâncias inibitórias contra algum dos microrganismos testados (tabela 5) e destas 31,1% (n=29) inibiram mais de um microrganismo patogênico, confirmando assim, o potencial deste grupo de microrganismos. Dentre os actinomicetos produtores de substâncias bioativas a maioria inibiu bactérias Gram-positivas. Basílio et al. (2003) avaliando a produção de compostos antimicrobianos por actinomicetos isolados de solo também verificaram uma alta taxa de inibição de bactérias Gram-positivas.

Saadoum et al. (1999) encontraram uma alta porcentagem contra cocos e bacilos Gram-positivos e uma menor atividade contra *Mycobacterium*

vaccae, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Em outros estudos realizados com actinomicetos endofíticos pertencente aos gêneros *Streptomyces*, *Microbispora*, e *Streptosporangium*, isolados de diferentes espécies de plantas, também foi observada atividade antagônica contra bactérias Gram-positivas e fungos (Araújo et al., 2000).

As espécies *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces melanosporofaciens* e *Streptomyces violaceusniger* foram caracterizadas por Williams et al. (1983a) por sua alta atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos.

Pode-se observar que entre os microrganismos alvos testados com relevância clínica, as espécies *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* foram os mais inibidos, evidenciando a capacidade dos actinomicetos em produzir metabólitos eficientes contra microrganismos Gram-positivos. Entre as inúmeras pesquisas na busca de novos metabólitos Kitouni et al. (2005) testaram 25 amostras de actinomicetos isolados de vários habitats contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* sendo que 8 e 7 amostras de actinomicetos inibiram os isolados respectivamente. Em pesquisas realizadas com fungos endofíticos, Peláez et al. (1998) constataram atividade antagônica de alguns fungos contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Avaliando a atividade bactericida de outras espécies de *Bacillus* Yilmaz et al. (2005) reportaram a produção de substâncias inibitórias contra *Staphylococcus aureus* sendo que em suas análises a espécie foi inibida por *Bacillus brevis*.

Neste trabalho *Micrococcus luteus* foi um dos microrganismos Gram-positivos menos inibido pelos actinomicetos, provavelmente devido à similaridade filogenética entre estes grupos. Alderson (1985) em estudos reportados sobre a filogenia intragrupos verificou a proximidade entre as espécies do gênero *Arthrobacter* e alguns *Micrococcus*, especificamente *Micrococcus luteus*, fato este pode estar associado à pouca atividade antimicrobiana dos actinomicetos contra estes microrganismos.

Durante a avaliação dos actinomicetos contra bactérias patogênicas Gram-negativas poucos isolados foram capazes de inibir este grupo. A baixa atividade contra bactérias Gram-negativas pode estar associada à estrutura complexa da membrana externa destes microrganismos. Em estudos sobre a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, Perez et al. (1993) reportaram que espécies como *Bacillus subtilis* MIR 15 apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Alsim et al. (2002) encontraram potencialidade nos padrões, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus brevis* que foram ativos contra *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*. Vários estudos demonstram a baixa atividade contra bactérias Gram-negativas. Os actinomicetos isolados de solo, amostras de água e cascas de árvores foram avaliados para a produção de metabólitos. Entretanto apenas três amostras foram ativas contra *Escherichia coli*, duas amostras de actinomicetos oriundas de água salgada foram bioativas contra *Proteus vulgaris* e dois isolados de amostras de solo foram metabolicamente ativos contra *Pseudomonas aeruginosa* (Kitouni et al., 2003). Em estudos anteriores Basílio et al. (2003) observaram que 230 isolados de

amostras de solo sob condições diferentes de pH e salinidade produziam metabólitos sendo que poucos foram ativos contra *Pseudomonas aeruginosa* (n=17) e *Serratia marcescens* (n=26).

De acordo com a análise da atividade antifúngica, os quais foram testados contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* houve uma atividade relativamente menor quando comparada com a atividade bacteriana, sendo que 21,5% (n=20) inibiram algumas das espécies testadas. Fungos são microrganismos eucariotos que exibem uma estrutura de célula similar a dos animais superiores, fato que dificulta a descoberta de compostos que seletivamente inibam o metabolismo de fungos sem exibir alguma toxicidade ao homem (Berdy, 1989). Ouhdouch et al.(2001) avaliaram a capacidade de produção de metabólitos antifúngicos de 320 actinomicetos isolados de vários habitats os quais apresentaram atividade contra 22 amostras de *Candida albicans* e 18 *Candida tropicalis*. Augustine et al. (2005) também constataram atividade antifúngica, sendo que dos 218 actinomicetos isolados 14% deles produziram metabólitos com atividade antifúngica.

A produção de metabólitos antifúngicos é influenciada pelos componentes do meio de cultura e condições de crescimento dos isolados como aeração, pH, temperatura, agitação as quais variam entre organismos (Iwai & Omura, 1982).

Em nosso trabalho também avaliamos certas condições as quais foram importantes para análise da produção de metabólitos. Quanto à influência da temperatura na atividade biocida, os isolados obtiveram uma ótima atividade na temperatura de 30°C. Na temperatura de 37°C os isolados apresentaram um

ótimo crescimento, porém pouca produção de metabólitos. Diferentes trabalhos têm reportado condições de otimização na produção de metabólitos, Iwai & Omura (1992) observaram dominância de padrões mesofílicos na produção de antibióticos. O gênero *Streptomyces* usualmente produz antibióticos em temperaturas próximas a 27°C (Ouhdouch et al., 2001). Actinomicetos termofílicos como *Thermactinomyces* produzem metabólitos bioativos em temperaturas superiores a 40°C.

O tempo de incubação também foi um fator que influenciou na atividade dos isolados testados, as amostras apresentaram halos de inibição maiores em períodos de 14 dias, fato associado à depleção de nutriente que favorece a produção do metabólito. Boudjella et al. (2005) isolaram actinomicetos de amostras de solo, os quais apresentaram uma boa atividade bioativa em 14 dias de incubação. Para a produção de metabólitos a menor prioridade é o crescimento rápido, assim quando o crescimento é restrito pela depleção de nutrientes ou a baixa disponibilidade de algum nutriente essencial o metabolismo secundário é expresso, assim o fato dos actinomicetos caracterizarem-se fisiologicamente pelo crescimento lento e serem microrganismos poucos exigentes o tempo de incubação associado a temperatura contribui para a produção de substâncias bioativas.

Embora a ordem *Actinomycetales* compreenda mais de 80 gêneros diferentes, a maioria dos metabólitos tem sido isolada de espécies de *Streptomyces*. Na análise de isolados produtores de compostos bioativos o gênero *Streptomyces* 70% dos isolados com atividade biocida contra alguns dos microrganismos testados. Esta alta frequência de espécies de

Streptomyces com atividade antimicrobiana tem sido observado em outros habitats como no solo e na água (Ouhdouch et al., 2001). O gênero *Nocardia* sp. representou 20,5%, *Terrabacter* sp. 8,6% na produção de substâncias. Além das espécies de *Streptomyces*, as quais são produtoras de compostos industrialmente importantes o gênero *Nocardia*, em nosso trabalho, mostrou um potencial na produção de compostos contra microrganismos patogênicos onde pode-se evidenciar ação contra *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, entre outros.

Basílio et al. (2003) analisando amostras de solo isolaram 335 padrões de actinomicetos, sendo que destes 235 eram pertencentes ao gênero *Streptomyces* e 100 actinomicetos a outros gêneros. Destas amostras 77% produziam substâncias bioativas. Muitos dos metabólitos produzidos são oriundos do gênero *Streptomyces*, no entanto outros gêneros de actinomicetos também apresentam a capacidade de produzir metabólitos de importância comercial. Trinta e três antibióticos produzidos por *Streptosporangium* são conhecidos os quais foram reportados por Cooper et al. (1990), Hida et al. (1995) e Takizawa et al. (1995). *Nocardiosis* e *Saccharothrix* isolados coletados de solos do deserto do Saara apresentaram atividade antagônica contra vários microrganismos patogênicos como reportado por Zitouni et al.(2005).

5.3. Atividade enzimática

5.3.1. Amilase

Para avaliação da atividade enzimática, diferentes substratos foram avaliados com o objetivo de testar o potencial biotecnológico dos

actinomicetos. Dentre os vários substratos testados o amido foi avaliado em pH 7 e pH 10. Os gêneros *Streptomyces* e *Nocardia* predominaram quanto à hidrólise deste substrato, fato que também foi reportado por Vigal et al. (1990). Sunna & Hashawa (1990) e Wjbenga et al. (1991) verificaram a produção de amilase por espécies de *Bacillus* em pH 8,6. Espécies endofíticas de *Nocardiopsis* também produziram amilase na fase logarítmica continuaram a secretar a enzima na fase estacionária em trabalho reportado por Stamford et al. (1998). A atividade da amilase produzida por *Nocardiopsis sp.* foi detectada em uma faixa de pH de 3,0 a 8,0 e a atividade enzimática ótima foi em pH 5,0.

A associação do desenvolvimento celular e a produção da enzima foi detectado por Davis et al. (1980) em *Bacillus sterothermophilus* e por Castro et al. (1993) em *Bacillus amyloliquefaciens*.

5.3.2. Proteases

Proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais. A habilidade para produzir uma variedade de enzimas pode ser um fenômeno atrativo em procariotos. De todos os isolados testados 94% foram capazes de hidrolisar a caseína, sendo que 122 isolados são pertencente ao gênero *Streptomyces*.

Gibb & Strohl (1988) observaram a produção de proteases por *Streptomyces peucetius*. Diferentes proteases foram isoladas de *Streptomyces lividans* reportadas por Aretz et al. (1989). Hozzein et al. (2004) reportaram produção de proteases por *Nocardiopsis alkaliphila*.

Entre o grupo dos actinomicetos *Thermoactinomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* e *Nocardiopsis* são os melhores produtores de proteases os

quais foram reportados por Kim et al. (1994). Proteases termofílicas de actinomicetos com uma alta atividade tem sido reportada por *Thermoactinomyces vulgaris* e *Nocardiopsis dassonvillei*.

Gey & Unger (1995) observaram em *Bacillus stearrowthermophilus* TP26 a produção de protease extracelular tendo uma temperatura ótima de produção de 75°C. Shumi et al. (2004) reportaram o isolamento de 25 amostras pertencente ao gênero *Bacillus sp.* oriundas de várias fontes, as quais foram purificadas e avaliadas em substratos contendo caseína, albumina e gelatina. Os autores observaram que os isolados apresentaram ótima atividade proteolítica em meio líquido.

Avaliando a capacidade dos actinomicetos isolados neste trabalho em hidrolisarem substratos como gelatina, 79 isolados foram capazes de produzir gelatinase, representado 40% dos isolados. Considerando, o baixo número de actinomicetos que foram capazes de hidrolisar este substrato, pode-se discutir que este fato possa estar associado ao meio de cultura que foi utilizado, meio rico em extratos e peptona além da temperatura que é um fator determinante para a degradação da gelatina. Os actinomicetos são microrganismos poucos exigentes podendo crescer em meios de culturas com predominância de sais e a temperatura ideal para o seu crescimento na maioria das vezes é 30°C. O gênero *Streptomyces* foi aquele que apresentou o maior número de isolados com capacidade de hidrólise da gelatina. Em um trabalho realizado com actinomicetos termofílicos isolados de amostras de solos 18 isolados apresentaram atividade colagenolítica (Gousterova et al.,1998). Azeredo et al. (2003) verificaram que um padrão de *Streptomyces* isolado de

solo de cerrado foi capaz de hidrolisar gelatina, caseína e albumina bovina, sendo uma característica bastante comum entre este grupo de microrganismos.

5.3.3 Celulases

Importantes enzimas estão envolvidas no processo de compostagem sendo que as celulases são de grande importância na degradação de materiais de origem vegetal.

A produção de celulases tem despertado a atenção devido à diversidade de aplicações bem como a facilidade de entendimento do mecanismo de hidrólise enzimática dos polímeros dos carboidratos das plantas (Bhat & Bhat., 1997). Neste trabalho a maioria dos isolados testados apresentaram atividade celulolítica (91%). Fato que demonstra a capacidade destes microrganismos de utilizarem uma variedade de fontes de carbono, sejam monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos. A produção de celulases por actinomicetos é avaliada por diversos trabalhos, nos quais empregam-se fontes de celulose (brutas e purificadas, cristalina e amorfa). As melhores condições para o crescimento e a produção destes microrganismos como temperatura, pH e concentração de substrato são cuidadosamente estudadas. Apesar da diversidade dos actinomicetos, o gênero *Streptomyces* é um dos maiores produtores de celulases deste grupo. Das amostras identificadas o gênero *Streptomyces* representou o maior número de amostras celulolíticas com 67% dos isolados. Das espécies de *Streptomyces* isolados por Ramirez e Coha (2003) 92% apresentaram a atividade celulolítica na presença de CMC e filtro de papel. Resultados similares foram encontrados por Wachimger et al. (1989), onde num total de 160 isolados, 100% hidrolisaram

celulose solúvel e somente 24 (15%) hidrolisaram celulose microcristalina. Os actinomicetos termofílicos tem recebido atenção especial devido à capacidade de produzirem enzimas estáveis em altas temperaturas em uma ampla faixa de pH. *Thermomonospora sp.* e *Thermomonospora fusca* exibiram uma ótima atividade celulolítica na presença de fontes solúveis (glicose, celobiose, xilose e carboximetilcelulose) em estudos realizados por George et al. (2001) e Spiridonov & Wilson (1998). Em nosso trabalho embora não tenhamos avaliado condições ideais para a produção de celulasas pode-se sugerir a análise com diferentes fontes de celuloses visando o potencial biotecnológico e a capacidade de degradação deste grupo de microrganismo.

5.3.4. Esterases e Lipases

No presente trabalho foram avaliados substratos para esterase e lipase, os quais foram testados em períodos de incubação diferentes (5,7 e 14 dias). De todas as amostras isoladas 88% apresentaram a esterase em 7 dias, sendo que os gêneros *Streptomyces* e *Nocardia* foram os melhores produtores, fato que demonstra a variabilidade dos actinomicetos quanto aos mais variados substratos de interesse comercial. Dentre os inúmeros microrganismos produtores de esterases Nishimura & Inouye (2000) em seus trabalhos verificaram que o gênero *Streptomyces* é um dos mais promissores na produção de esterase.

Dos isolados testados 44% apresentaram a enzima lipase com predomínio de isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces sp.* Neste substrato os isolados foram observados periodicamente sendo que alguns isolados foram capazes de hidrolisar o substrato em 5 dias de incubação. Em

trabalho reportado por Abramic et al. (1999) uma lipase extracelular foi isolada de *Streptomyces rimosus*, sendo que a enzima foi mais ativa em temperaturas entre 50°e 60°C. Perez et al. (1993) e Cruz (1994) reportaram a produção de lipase em espécies de *Streptomyces albus*, *Streptomyces lividans*. Vários outros microrganismos foram reportados como fontes de lipases como *Bacillus sp.* relatados por Kim et al. (1994); Schmidt et al. (1994); Luisa et al. (1997). Nossos resultados podem sugerir que os actinomicetos são muito importantes na decomposição de lipídeos presentes no material orgânico.

5.3.5. Pectinases

Os actinomicetos são importante na degradação de resíduos vegetais. As enzimas pectinolíticas ocupam um papel chave na maceração dos tecidos das plantas através da degradação de pectina localizada na lamela média e na parede celular dos vegetais (Collmer & Keen, 1986). Os resultados obtidos foram que cerca de 26% dos isolados hidrolisaram o substrato sendo que 28 isolados são pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Os estudos com actinomicetos pectinolíticos tem principalmente revelado a presença de pectato liases. Poucas informações são avaliadas quanto ao sistema pectinolíticos. Em *Streptomyces viridochromogenes* foi detectada por Agate et al. (1962) a produção de pectato liases. A pectato liase também foi purificada e caracterizada em *Thermomonospora fusca* (Stutzenberger,1987). A produtividade de pectinases e o fenômeno regulatório foram estudados em tipos de cultivos diferentes (meio sólido e meio líquido) em *Aspergillus niger* por Pereira et al.(1993), os quais observaram a ampla produção da enzima quando cultivado em meio líquido. Um grupo de 17 padrões de fungos termofílicos de

Thermomyces lanuginosus foram examinados para a produção de xilanases, β -mannanases, arabinases e pectinases, sendo que algumas destas amostras apresentaram atividade pectinolítica quando crescidas em meio contendo pectina cítrica (Puchart et al., 1999). Com os resultados obtidos no presente trabalho pode-se sugerir a avaliação de melhores condições para a produção deste substrato, pois os actinomicetos são considerados bons produtores de enzimas pectinolíticas. Porém, no presente trabalho não foram realizadas variações em condições de cultivos, principalmente nas alterações de meio de cultura ou temperatura. Provavelmente se estas condições tivessem sido alteradas um maior número de isolados apresentariam atividade pectinolítica.

6. CONCLUSÕES

1. Os gêneros *Streptomyces* e *Nocardia* foram os predominantes na avaliação da leira de compostagem.
2. A atividade inibitória dos actinomicetos contra bactérias Gram-positivas foi evidenciada na maioria dos isolados produtores de metabólitos.
3. O gênero *Streptomyces* foi o que apresentou a melhor atividade biocida contra os microrganismos testados.
4. A temperatura de 30°C e o período de incubação de 14 dias foram as melhores condições para a produção dos metabólitos secundários.
5. A ocorrência de inúmeras enzimas com potencial biotecnológico foi evidenciado neste grupo de microrganismo.
6. A identificação de actinomicetos requer metodologias mais específicas visando resultados mais rápidos e precisos na determinação dos gêneros e das espécies.

7. PERSPECTIVAS

1. Avaliar a capacidade dos actinomicetos mais promissores em produzir antibióticos utilizando diferentes condições de crescimento.
2. Testar os actinomicetos produtores de substâncias bioativas contra fungos filamentosos bem como ampliar o número de bactérias com relevância clínica.
3. Avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade e a estabilidade dos metabólitos produzidos pelos actinomicetos.
4. Caracterizar a estrutura química fundamental dos metabólitos produzidos.
5. Avaliar a atividade das enzimas extracelulares em diferentes substratos, temperaturas e bem como a sua potencialidade.
6. Desenhar oligonucleotídeos iniciadores que possam ser utilizados na PCR para posterior seqüenciamento, facilitando assim, a identificação dos actinomicetos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMIC, M. et al. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. **Enzyme and Microbiology Technology**, New York, v. 25, p. 522-529, 1999.

AGATE, A. D.; BILIMORIA, M. H.; BHAT, J. V. Pectin transeliminase activity in *Streptomyces viridochromogenes*. **Current Science**, Bangalore, v. 31, p. 462-463, 1962.

ALDERSON, G. Menaquinone composition in the classification of *Streptomyces* and other sporoactinomycetes. **Journal of General Microbiology**, London, v. 131, p. 1671-1679, 1985.

ALSIM, B.; SAGLAM, N.; BEYATLI, Y. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil Turkey. **Journal of Biological**, Osaka, v. 26, 41-48.

AL-TAI, A. et al. *Streptomyces malaysiensis* sp. a new streptomycete species with rugose, ornamented spores. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 1395-1402, 1999.

ANTUNES, G. S. **Manual de Diagnóstico Bacteriológico**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 278p.

ANZAI, Y.; OKUDA, T.; WATANABE, J. Application of the random amplified polymorphic DNA using polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbiological screening. **Journal Antibiotic**, Tokyo, v. 47, p. 183-193, 1994.

ARAUJO, J.M.; SILVA, A.C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, p. 447-451, 2000.

ARETZ, W.; KOLLER, K.P.; RIESS, G. Proteolytic enzymes from recombinant *Streptomyces lividans* TK 24. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 65, p. 31-35, 1989.

AUGUSTINE, K. A.; BHAVSAR, S.P.; KAPADNIS, B. P. Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK36. **Indian Journal Medical**, Calcutta, v. 121, p. 164-170, 2005.

AZEREDO, L. A I. et al. Protease from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian Cerrado soil. Optimization of culture medium employing statistical experimental desing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 105, p. 749-755, 2003.

BAJPAI, P.; SHARMA, U. Production of α -amylase in a low cost medium by *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. **Journal of Fermentation Biotechnology**, Oxford, v. 67, p. 422-423, 1989.

BALASHEV, K. et al. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces: Part I. Atomic force microscopy. **Biochimie**, Paris, v. 83, p. 387-397, 2001.

BARRINGTON, S. et al. Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. **Bioresource Technology**, Essex, Inglaterra, v. 83, p. 189-194, 2002.

BASILIO, A. et al. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 814-823, 2003.

BEG, Q. K. et al. **Bleach-boosting of eucalyptus kraft pulp using combination of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3.** Emmaus : Panjab University, 2001.p. 71-78,(Res. Bull,57).

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam,v. 13, p. 25-58,1994.

BELL, K. S. et al. The genus *Rhodococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, p. 195-210,1998.

BERDY, J. The discovery of new bioactive microbial metabolites screening and identification. In: BUSHELL, ME; GRAFE, U. (Ed). **Bioactive metabolites from microorganisms**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989. p. 3-25.

BERDY, J. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. In: Perlman D. (ed) **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, p. 308-406, 1974.

BERTOLDI, M. Composting food processing waste in the european economic community. **Compost Science and Utilization**, Emmaus, v. 3, n.2, p. 87-92, 1995.

BHAT, M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 355-383, 2002.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes & their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, p. 583-560, 1997.

BIELY, P. et al. Substrate specificity and of action of acetyl-xylan esterase from *Streptomyces lividans*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v 396, p. 257-260, 1996.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials substrates, microorganism, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 3, p. 90-104, 1981.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p. 73-81, 2002.

BROWN, C. Enzyme technology. In: WILKINSON, J. (ed) Introduction to Biotechnology. Oxford: Black Well Scientific, 1987.

BU' LOCK , J. D. "**Industrial Aspects of Biochemistry**". Amsterdam: North Holland Pub, 1974. v 1, Não paginada.

BU'LOCK, J. D. "Industrial Aspects of Biochemistry". **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 3, p. 293-342, 1961.

BURCHET, J. et al. Cellulases – tools for modification of cellulosic materials. **In: CONFERENCE OF THE TEXTILE INSTITUTE**, Manchester, 1997. [Proceedings...]: Niches in the World of Textiles World. Essel, England, 1997.

BURJA, A.; WRIGHT, P. Look first to nature before invention. Industrial Applications for marine cyanobacteria. **SIAM News**, Philadelphia, v. 53, p. 4-9, 2003.

BOUDJELLA, H. et al. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporagium* Sg isolated from a Saharan soil. **Microbiological Research**, Cambridge, p. 1-11, 2005.

CARR, J. G. Tea coffee and cocoa. **Microbiology of Fermented Foods**, Oxford, v. 2, p. 133-154, 1985.

CASTRO, G. R. MENDEZ, B. S.; SIÑERIZ, F. Amylolytic enzymes produced by *Bacillus amyloliquefaciens* MIR-41 in batch and continuous culture. **Journal of Chemical Technological and Biotechnology**, Oxford, v. 50, p. 289-294, 1993.

CHATTERJEE, A. K.; STARR, M. P. Genetics of *Erwinia* species. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 34, p. 645-676, 1980.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 438-443, 2003.

CHOWDARY, G. V.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: multivariate analysis. **Process Biochemistry**, London, v. 36, p. 331-339, 2001.

COLLMER, A.; KEEN, N. T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 383-409, 1986.

COLMAN, M. H.; MACRAE, A. R. UK Patent No. 1577933. 2^oed. New York: [s.n.], 1980.

CONNELL, N. D. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 12, p. 446-449, 2001.

COOPER, R. et al. Characterization of peptidyl-nucleoside antifungal antibiotics from fermentation both. **Journal Indian Microbiology**, Nagpur, v. 5, p. 1-8, 1990.

COWAN, D. Industrial enzyme technology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, p. 177-178, 1996.

CRAWFORD, D. et al. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 3899-3905, 1993.

CRAWFORD, D. L.; MCCOY, E. Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiasticus*. **Applied Microbiology**, Washington, p. 150-152, 1972.

CRUZ, H. et al. Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. **Gene**, Amsterdam, v. 144, p. 141-142, 1997.

DAVIS, P.E.; COHEN, D.L.; WHITAKER, A. The production of alpha amylase in batch and chemostatic culture. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 4, p. 391-398, 1980.

DEES, P. M.; GHIORSE, W. C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PC-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 201-216, 2001.

DEMIRIJAN, D.; MORIS-VARAS, F.; CASSIDY, C. Enzymes from extremophiles. **Current Opinion in Chemical Biological**, London, v. 5, p. 144-151, 2001.

DIETZ, A. **Structure and taxonomy of Streptomyces: The bacteria, Antibiotic Producing Streptomyces**. Orlando: Academic Press, 1986. v. 9, p. 1-25.

DRUCKER, D. B. **Microbiological Applications of Gas Chromatography**. Cambridge : Cambridge University Press, 1981.

EMBLEY, T. M.; STACKEBRANDT, E. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto v. 48, p. 257-289, 1994.

ENSIGN, J. C. Formation, properties and germination of actinomycete spores. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 32, p. 185-219, 1978.

FOGARTY, A. M; TUOVINEN, O. H. Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, p. 225-233, 1991.

GALLAGHER, J. et al. Production of cellulase and β -glucosidase activity during growth of the actinomycete *Micromonospora chalcae* on cellulose-containing media. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 18, p. 537-540,1996.

GASPARI, F et al. Myxobacteria isolated in Israel as potential source of new anti-infectives. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, p. 429-439,2005.

GEORGE, S.P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. Studies on carboxymethylcellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, p. 171-175,2001.

GEY, M.; UNGER, K. Calculation of the molecular masses of two newly synthesized thermostable enzymes isolated from thermophilic microorganisms. **Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 166, p. 188-193,1995.

GIBB, D. G.; STROHL, R. W. Physiological regulation of protease activity in *S. penutius*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.34, p. 187-190, 1988.

GOMEZ, A. The evaluation of compost quality. **Trends in Analytical Chemistry**, [S.1], Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 310-314,1998.

GROTH, I. et al. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustilio). **Journal of Microbiology Methods**, London, v. 36, p. 115-122, 1999.

GOUSTEROVA, A. et al. Thermophilic *Actinomycetes* as producers of collagenase. **Comparative Review Science Academic Bulgaria**, Bulgaria, v. 51, p. 71-74, 1998.

HABA, E. et al. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 40-44, 2000.

HAMSAVENI, D. R.; PRAPULLA, S. G.; DIVAKAR, S. Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. **Process Biochemistry**, London, v. 36, p. 1103-1109, 2001.

HARADA, K. Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 52, p. 889-899, 2004.

HARTILIEB, N; MARSCHNER, B; KLEIN, W. Transformation of Dissolved Organic Matter (DOM) and ^{14}C -labelled organic contaminants during composting of municipal biowaste. **The Science of the Total Environment**, [S.1], Fairfax, n. 278, p. 1-10,2001.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **DDT**, Brasília, v. 5, p. 294-300,2000.

HEUER, H et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing

gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HIDA, T. et al. Synthesis and biological activities of TAN-1511 analogues. **Journal Antibiotic**, New York, v. 48, p.589-603, 1995.

HOLT, J. G. ;WILLIAMS, S. T. ;SHARPE, M. E. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. **Baltimore. Williams & Wilkins, 1989. v. 4, p. 2300-2648.**

HOONDAL, G.S. et al. Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Berlin, v. 59, p. 409-418, 2000.

HORAN, A. C. Secondary metabolite producing actinomycetes other than *Streptomyces*. In: **ENCYCLOPEDIA of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation**. Oxford : Black Well Scientific, 1999. p. 2333-2348.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles from an industrial point of view. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 18, p. 259-270, 1996.

HOWARD, R. et al. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion & enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, Ibadan, v. 2, p. 602-619, 2003.

HOZZEIN, W. et al. *Nocardiopsis alkaliphila* nov. a novel alkaliphilic actinomycetes isolated from deserte soil in Egypt. Int. **Journal of Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p.247-252, 2004.

ISHAQUE, M; KLUEPFEL, D. Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 26, p. 183-189, 1980.

IWAI, Y.; TAKAHASHI, Y. Selection of microbial sources of bioactive compounds. In: OMURA, S. (Ed.) **The search bioactive compounds from microorganisms**. New York: Spring-Verlag, 1992. p. 281-302.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAHANGIR, R. et al. The influence of protein adsorption and surface modifying macromolecules on the hydrolytic degradation of a poly (ether-urethane) by cholesterol esterase. **Biomaterials**, Surrey, v. 24, p. 121-130, 2003.

JAHNEL, M. C.; MELLONI, R.; CARDOSO, E. J. B. Maturidade de composto de lixo urbano. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.2, 1999. Não paginada.

KASHYAP, D. R. et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus sp.* DT7. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 277-282, 2000.

KATAOKA, M. et al. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification the genus *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 151, p. 249-255,1997.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U.T. Biotransformation with lipases. In: Rehm HJ, Pihler G, Stadler A, Kelly PJW, editors. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 8 p. 37-192, 1998.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v 74, p. 65-76, 1999.

KIM, G. J. et al. Purification and characterization of an erythromycin resistant *Pseudomonas sp.* GD 100. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam,v. 210, p. 239-244,2002.

KIM, S. B. et al. *Streptomyces thermocarboxydovrans* sp. nov. and *Streptomyces thermocarboxydus* sp. nov., two moderately thermophilic carboxydrotrophic species from soil. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 48, p.59-69,1998.

KIM, H. et al. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus sp.* Strain 398. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 58, p. 961-962, 1994.

KIRAN, K. R.; BABU, C. V. S.; DIVAKAR, S. Thermostability of porcine pancreas lipase in non-aqueous media. **Process Biochemistry**, London, v. 36, p. 885-892, 2001.

KITOUNI, M. et al. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. **Journal de Mycologie Medicale**, Paris, v.15, p. 45-51,2005.

KIYOTA, H. et al. **Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate**. Tetrahedron: Asymmetry, Oxford,v. 12, p. 1035-1038, 2001.

KLUYVER, A. J.; NIEL van. C. B. Prospects for a natural system of classification of bacteria. **Zentralblatt Fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene. Abt. 1** ,Supplementheft, Stuttgart, v. 94, p. 369-403,1936.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. São Paulo: Editora Guanabara,1999. p.1840-1879.

KOTZEKIDOV, P. Production of polygalacturonases by *Byssachlamys fulva*. **Journal Indian Microbiology**, Nagpur,v. 7, p. 53-56, 1991.

KRASIL'NIKOV, N. A. ; YUAN, T. The specific composition of the orange actinomycetes. Biology of Selected Groups of Actinomycetes, (in Russian), **Journal of General Microbiology**, London, v. 8, p. 28-57,1965

KRISHNA, S. H.; KARANTH, N. G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A kinetic study. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1547, p. 262-267, 2001.

KUMAR, H. D. **A text book of biotechnology**. New Delhi : Affiliated East-West press private, 1998. p. 173.

KWO-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Medical Micrology, Malvern, PA: Lea & Febiger, **Journal of General Microbiology**, London, p. 581-588, 1992.

LACEY, J. Actinomycetes in composts. **Annual Agriculture Environmental Medical**, Washington, v. 4, p. 113-121, 1997.

LAZZARINI, A. et al. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 78, p. 399-405, 2000.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*) **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 77, p. 348-352, 1994.

Li, W. et al. *Streptomyces scopiformis* sp. a novel streptomycete with fastigiate spore chains. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 1629-1633, 2002.

LI, X. et al. Endoglucanase S, a novel endocellulase exhibiting exoglucanase activity from a newly isolated *Streptomyces* sp LX. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, p. 347-358, 1998.

LI, X. ; GAO, P. CMC-liquefying enzyme a low molecular mass initial cellulose-decomposing cellulases responsible for fragmentation from *Streptomyces* sp.LX. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, p. 59-66, 1997.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. (Ed.). Industrial biotransformation. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

LUISA, M. R. et al. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*, Large scale production, purification and properties: aggregation behavior and its effect on activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 56, p. 89-102, 1997.

MAcFADDIN, J. M. Q. Biochemical tests for Identification of medical Bacteria. **Baltimore: Williams & Wilkins, 2000. 912p.**

MADEJÓN, et al. New approaches to establish optimum moisture content or compostable materials. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 85, p. 73-78, 2002.

MALEK, M. A. et al. Bacterial cellulases and saccharification of lignocellulosic materials. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 10, p.750-753, 1988.

MANN, J. "Secondary Metabolism". **Oxford, UK: Oxford University Press, 1978.**

MARA, D.D.; ORAGUI, J. I. Occurrence of *Rhodococcus coprophilucus* and associated actinomycetes in feces, sewage and freshwater. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 42, p. 1037-1042, 1981.

MARTIN, J. F. ; DEMAIN, A. L. Control of antibiotic synthesis. **Review Microbiology**, New York, v. 44, p. 230-251, 1980.

MASSE, L.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S.P. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 76, p. 629-635, 2001.

McCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in environment – a review. **Gene**, Amsterdam, v. 115, p. 189-192, 1990.

MEHLING, A.; WEHMEIER, V. F.; PIEPERBERG, W. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycetes genomes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 128, p. 119-126, 1995.

MISHRA, S. K.; GORDON, R.E.; BARNETT, D.A. Identification of *Nocardiae* and *Streptomyces* of medical importance. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 11, p. 728-736, 1980.

MIYADOH, S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. **Actinomycetologia**, Amsterdam, v. 9, p. 100-106, 1993.

MORCIARDINI, P. et al. New PCR primers for selective amplification of 16S rDNA from different group of actinomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 142 p. 419-429, 2002.

MOZERSKY, S.; MARMER, W.; DALE, A. O. Vigorous proteolysis: Relining in the presence of an alkaline protease and bating (Post- Liming) with an extremophile protease. **JALCA 97**, p. 150-155, 2002.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes – a review. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, New York, v. 19, p. 355-361, 1998.

NAKAMURA, H. et al. Modification of pulp properties by cellulase treatment and application of cellulose to wastepaper deinking and mechanical pulp refining. In: PULP AND PAPER RESEARCH CONFERENCE, 68, [s.l.], 2001. **Proceedings [S.l.]**, 2001. v.18, p. 2-5.

NIEHAUS, F. et al. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, p. 711-729, 1999.

NISHIMURA, M.; INOUE, S. Inhibitory effects of carbohydrates on cholesterol esterase biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* H646.SY2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 90, p. 564-566, 2000.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 2002.

ORCHARD, V. A. GOODFELLOW, M. The selective isolation of *Nocardia* from soil using antibiotics. **Journal of General Microbiology**, London, v. 85, p. 160-162, 1980.

OSBORNE, J. M.; DEHORITY, R. M. Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 2247-2250.

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

PADILHA, G. Biologia Molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. Em Melo, I. S. e Azevedo, J. L. **Ecologia Microbiana**. Embrapa, Jaguariúna, 327-347, 1998.

PAQUET, V. et al. Purification and characterization of the extracellular alpha amylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 212-218, 1991.

PELÁEZ, F. et al. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 755-761, 1998.

PERCICH, J. A., LOCKWOOD, J. L. Interaction of atrazine with soil microorganisms population change and accumulation. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 1145-1152, 1978.

PEREIRA, S. et al. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 39, p. 36-41, 1993.

PEREZ, C. et al. Cloning, characterization and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. **Gene**, Amsterdam, v. 123, p. 109-114, 1993.

PEREZ, C.; SUAREZ, C.; CASTRO, G. R. Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster. **Folia Microbiology**, Delft, v. 38, p 25-28,1993.

PETERES, S. et al. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 930-936,2000.

POONAM, N.; DALEL, S. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v. 17, p. 770-778, 1995.

PRAUSER , H. Phages host range in the classification and identification of Gram-positive branched and related bacteria. **Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes**, Florida: Academic Press, 1974.Orlando. p. 617-633.

PUCHART, V. et al. Production of xylanases, mannanases and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, v. 24, p. 355-361, 1999.

RAMIREZ, P.; COHA, J. M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termofílico: Aislamiento , caracterización y determinación de la actividad celulolítica. **Revista Peruana Biológica**, Lima, v. 10, n. 1, p. 67-77, 2003.

RAO, M. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62,p. 597-634, 1998.

ROBERTS, M. A.; CRAWFORD, D. L. Use of randomly amplified polymorphic DNA as a means of developing genus-and strains-specific *Streptomyces* DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 2555-2564,2000.

ROWBOTHAM, T. J; CROSS, T. Ecology of *Rhodococcus coprophylus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. **Journal of General Microbiology**, London, v. 100, p. 231-240,1977.

SAADAUN, I.; GHARAIBEH, R. The *Streptomyces* flora of region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **Journal of Arid Environments**, London ,v. 53, p. 365-371, 2003.

SAADAUN, I.; HAMEED, K. M.; MOUSSAUUI, A. Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. **Microbios**, Cambridge, v. 99, p. 173-179, 1999.

SANGLIER, J. J. et al. Review of actinomycete compounds. **Expert Opinion and Investigational Drugs**, Boston, v. 5, p. 207-223, 1996.

SATO, M.; KAJI, A. Another pectate lyase produced by *Streptomyces nitrospreus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 44, p. 1345-1349, 1981.

SCHMIDT, C. et al. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatelnulatus*. **Biochimic and Biophysica Acta**, Amsterdam ,v. 1214,p.43-53,1994;

SCHRIJVER, A.; MOT, R. Degradation of pesticides by actinomycetes. **Critical Reviews in Microbiology**, Cleveland, v. 25, p. 85-119, 1999.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, p.627-662, 2001.

SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Retrospective evaluation of international *Streptomyces* project taxonomic criteria. In: Arai (Ed.) Actinomycetes-The Boundary Microorganisms. Toppan Co.Ltd., Toykyo, p. 9-41,1976.

SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v 16, p. 313-340,1966.

SHUMI, W. et al. Isolation and purification of *Aspergillus funiculosus* G. Smith and its enzyme protease. Pak. **Journal Biological Science**, Amesterdan, v. 7, p. 312-317, 2004.

SINGH, S. A.; RAMAKRISHANA, M.; RAO, A. G. A. Optimization of down-stream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented broth of *Aspergillus carbonarius*. **Process Biochemistry**, London,v. 35, p. 411-417, 1999.

SPANO, L.; MEDEIROS, J.; MANDELS, M. In: Enzymatic Hydrolisis of Cellulosic Waste to Glucose (Pollution Abatement Div., Food Svcs. Lab, US Army Natick Labs), Natick, MA, p.1975.

SPIRIDONOV, N. A.; WILSON, D.B. Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. **Journal of Bacteriology**, Washington, p. 3529-3532,1998.

SPOONER, F. R.; HAMMERSCHMIDT, R. Jr. Characterization of extracellular pectic enzymes produced by *Streptomyces* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v.79, p. 1190, 1989.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A. WARD-RAINEY, N.L. Proposal for a new Hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, p. 479-491,1997.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; ARAUJO, J.M. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupe (*Pachyrhizus erosus* L.Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18,p.382-385,1998.

STAMFORD, T. L.M. **Actinomicetos endofíticos isolados do jacatupé *Pachyrbizus erosus*. urban produtores de enzimas amilolíticas.** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1997. 196p. Tese de doutorado.

STANLEY, T. W.; SHARPE, M. E.; HOLT, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. v. 4. **Williams & Wilkins, 1989.**

STUTZENBERGER, F. J. Inducible thermoalkalophilic polygalacturonate lyse from *Thermomonospora fusca*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 2774-2780, 1987.

SUNNA, A.; HASHWA, F. Thermostable amylase from an aerobic Gram-positive monspore forming thermophilic bacteria. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 12, p.433-438, 1990.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I.; WIECZOREK, J. Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. **Enzyme and Microbiol Technology**, New York, v. 10, p. 492-497,1988.

SUUTARI, M. et al. Characterization of *Streptomyces sp.* Isolated from water-damaged buildings. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 39, p. 77-84, 2002.

TADDEI, A. et al. Isolation and identification of *Streptomyces sp.* from Venezuelan soils: Morphological and Biochemical studies. **Research in Microbiology**, Paris, p. 1-10, 2005.

TAIWO, L. B.; OSO, B. A. Influence of composting techniques on microbial succession, temperature and pH in a composting municipal solid waste. **African Journal Biotechnology**, Ibadan, v. 3, n. 4, p. 239-243,2004.

TAKIZAWA, M. et al. TAN-1511 A,B and C , microbial lipopeptides with G-CSF inducing activity. **Journal Antibiotic**, New York, v. 48, p. 579-588, 1995.

THOMSON, C. A.; DELAQUIS, P. J.; MAZZA, G. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 39, p. 165-187, 1999.

TUNCER, M. et al. Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces sp.* F2621 isolated in Turkey. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, 783-791, 2004.

TUOMELLA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 72, p. 169-183, 2000.

TURSCH, B.; BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D. **Experientia**, Basel, v. 32, p. 401-407, 1976.

VALENZUELA, J. F. et al. Biochemical, Identification and Molecular Characterization (PCR-RFLP) of *Nocardia* isolates from Sputum. **Archives of Medical Research**, México, v. 36, p. 356-361, 2005.

VAN DER MAAREL, M. et al. Properties and applications of starch converting enzymes of the α -amylase family. **Journal Biotechnology**, Oxford, v. 94, p. 137-155,2002.

VAN WYK J.; MOGALE, A.; SESENG, T. Bioconversion of wastepaper to sugars by cellulase from *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*. **Journal of General Microbiology**, London, v.37, p. 123-128,2001.

VANDAMME, E. J. Antibiotic search and production: an over-view. In: Vandamme E. J. (ed). **Biotechnology of industrial antibiotics**, New York, p. 3-32,1974.

VEERARAGAVAN, K. A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 186, p. 301-305, 1990.

VIGAL, T. et al. Cloning characterization and expression of an alpha amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. **Molecular General Genetic**, Berlin, v. 225, p. 278-288, 1991.

VIKARI, L.; TENAKANEN, M.; SUURNAKKI, A. Biotechnology in the pulp and paper industry. In: Rehm H.J. (ed). **Biotechnology**, Frankfurt, VCH-Wiley; p. 523-546, 2001.

VORAGEN, F. G. J.; HEUTINK, R.; PILNIK, W. Solubilization of apple cell walls with polysaccharide degradation enzymes. **Journal Applied Biochemical**, San Diego, v. 2, p. 452-468, 1980.

WACHINGER,G. et al. Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington,v. 55, p. 2653-57,1989.

WAKSMAN, S.A. The actinomycetes and their antibiotics. In: Umbreit W W(ed). **Advances in Applied Microbiology**, San Diego,v. 5, Academic, New York, p. 235-316, 1963.

WARD, O.P.; MOO-YOUNG, M. Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides. CRC **Critical Reviews Biotechnology**, Boca Raton,v. 8, p. 237-274, 1989.

WEI, Y-S. et al. Composting at compost application in China. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 30, p. 277-300, 2000.

WEPPEN, P. Process calorimetry on composting of municipal organic wastes. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 21, p.289-299, 2001.

WHITAKER, R. J. Microbial pectolytic enzymes. In: W. M. Fogarty & C. T. Kelly (ed), **Microbial Enzymes and Biotechnology**, London, p. 133-175, 1989.

WIJBENGA, D. J. et al. Production of native-starch-degrading enzymes by a *Bacillus firmus* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, p. 180-184, 1991.

WILLIAMS, S. T. et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, p. 1743-1813, 1983a.

WILLIAMS, S.T. et al. A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, p. 1815-1830, 1983b.

WOODRUFF, M. B. Productivity and species richness across an environmental gradient dependent ecosystem. **Science** **80**, Washington, p. 1225-1229, 1980.

XU, L. et al. *Streptomyces thermogriseus*, a new species of the genus *Streptomyces* from soil, lake and hot-spring. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 1089-1093, 1998.

YAZDIL, M. T. et al. Cellulase production by *Neurospora crassa*: Purification and characterization of cellulolytic enzymes. **Enzyme And Microbial Technology**, New York, v. 12, p. 120-123, 2000.

YILMAZ, M.; SORAN, H.; BEYATLI, Y. Antimicrobial activities of some *Bacillus* sp. strains isolated from the soil. **Research in Microbiology**, Paris, p. 1-5, 2005.

ZITOUNI, A. et al. *Nocardiopsis* and *Sccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. **Research in Microbiology**, Paris, v.1, p. 1-10, 2005.

9. APÊNDICES

9.1. Meios de culturas utilizados para o isolamento e identificação dos actinomicetos

9.1.1. Agar Amido Caseína (ACA)g/L

Amido	10,0g
Caseína	0,3g
Nitrato de Potássio	2,0g
NaCl	2,0g
Fosfato de Potássio Dibásico	2,0g
Sulfato de Magnésio	0,05g
Sulfeto Ferroso	0,01g
Agar	18,0g
Solução basal	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,64g
KH_2PO_4	2,38g
K_2HPO_4	5,65g
MgSO_4	1,0g
Solução I	1,0ml
Agar	18,0g
Solução I – Solução de Pridham na Gottlieb/100mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,64g

FeSO₄.7H₂O 0,11g

MnCl₂.4H₂O 0,79g

ZnSO₄.7H₂O 0,15g

*Controle positivo: adiciona-se 1mL de uma solução de glicose 10%(concentração final 1%).

*Controle negativo: nenhuma fonte de carbono é adicionada.

* Fonte de carbono a ser testada: adiciona-se 1ml de uma solução 10% (concentração final de 1%).

9.1.3. Meio base para a utilização de fontes de nitrogênio g/L

Glicose 10,0g

MgSO₄.7H₂O 0,05g

NaCl 0,05g

FeSO₄.7H₂O 0,001g

K₂HPO₄ 0,1g

Azul de bromotimol 0,03g

Agar 12,0g

*Fonte de Nitrogênio a ser testada adiciona-se 0,1g

*Controle negativo não tem nitrogênio

*Controle positivo tem 0,1g de L-asparagina ou prolina

9.1.4. Meio para degradação do Amido g/L

Amido 1,0g

Peptona 5,0 g

Extrato de Carne 3,0 g

NaCl 0,5g

9.1.4.1. Meio para degradação de amido pH 10

Peptona 5,0 g

Extrato de carne 3,0 g

NaCl 5,0 g

Agar 2,0g

Tris 2 M

9.1.5. Meio para degradação da Caseína g/200mL

10,0g

Solução A: Leite em pó desnatado

Água 90,0mL

Solução B: Agar 3,0g

Água 97,0mL

9.1.6. Agar Esculina g/L

Extrato de levedura 5,0g

Agar Nutriente 1,5g

Esculina 0,1g

Citrato Férrico Amoniacal 0,05g

9.1.7. Agar Gelatina g/L

Gelatina 120,0g

Extrato de carne 3 g

Peptona 5 g

Água Destilada 1000mL

9.1.8. Meio para produção de gás sulfídrico g/L

9.1.8.1. Caldo Nutriente

Peptona 5,0g

Extrato de carne 3,0g

Água Destilada 1000mL

*A produção de H₂S é verificada através de fitas de papel que foram embebidas em Solução de Acetato de Chumbo a 1%

9.1.9. Caldo NaCl 7,10 e 13%

Caldo BHI (Bióbrás) mais NaCl nas concentrações de 7,10 e 13%

9.1.10. Caldo Nitrato

Extrato de Carne 3,0g

Peptona 5,0g

Nitrato de Potássio 1,0g

9.1.11. Meio para degradação da Tirosina g/L

:Meio Basal: Extrato de Carne 3,0g

Peptona 5,0g

Agar 15,0g

Suspensão: Tirosina 0,4g

Água 100,0mL

9.1.12. Meio para a degradação da Xantina g/L

Meio Basal:

Extrato de Carne 3,0g

Peptona 5,0g

Agar 15,0g

Suspensão:Xantina 0,5g

Água 100,0mL

9.1.13. Agar Glicerol Asparagina g/L

Glicerol 10,0g

L-asparagina 1,0g

K₂HPO₄ 1,0g

Agar 20,0g

9.1.14. Agar Sais Minerais g/L

Amido 10,0g

(NH₄)₂SO₄ 2,0g

CaCO₃ 2,0g

K₂HPO₄ 1,0g

NaCl 1,0g

Agar	20,0g
------	-------

9.1.15. Agar Tirosina g/L

Glicerol	15,0g
----------	-------

L-tirosina	0,5g
------------	------

L-asparagina	1,0g
--------------	------

$K_2 HSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5g
-------------------------	------

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5g
----------------------	------

NaCl	0,5g
------	------

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01g
----------------------	-------

Água	1000,0mL
------	----------

Solução traço	1,0mL
----------------------	--------------

Solução traço: $FeSO_4$	0,1g
-------------------------	------

$MnCl_2$	0,1g
----------	------

$ZnSO_4$	0,1g
----------	------

Água	100,0mL
------	---------

9. 1.16. Meio de Tuncer (atividade para carboximetilcelulose) g/L

Carboximetilcelulose	5,0 g
----------------------	-------

Extrato de levedura	6,0 g
---------------------	-------

$(NH_4)_2SO_4$	0,1 g
----------------	-------

NaCl	0,3 g
------	-------

$MgSO_4$	0,1 g
----------	-------

$CaCO_3$	0,02 g
----------	--------

Agar	15,0 g
------	--------

Solução Traço	1 mL
----------------------	-------------

$FeSO_4$	0,1%
----------	------

ZnSO ₄	0,09%
MnSO ₄	0,02%
Água	100,0 mL

9. 1.17. Meio para a atividade lipolítica g/L

Peptona	5g
Extrato de levedura	1g
NaCl	4g
Agar	10g
Óleo de oliva	2,5%
Solução de rodamina B (10mL)	0,001%

9.1.18. Meio para atividade de esterase g/L

Peptona	5g
Extrato de levedura	1g
NaCl	5g
Agar	15g
CaCl ₂	0,01%
Tween 80	1%

9.1.19. Ágar Sabouraud

Glicose	2%
Peptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
Agar	2%