



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SILVIA KATRINE SILVA ESCHER

BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE
***Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga) DA AMAZÔNIA E AVALIAÇÃO DA**
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

RECIFE, 2016

SILVIA KATRINE SILVA ESCHER

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE
Aniba parviflora Syn *Fragans* (Macacaporanga) DA AMAZÔNIA E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. ELBA LÚCIA CAVALCANTI DE AMORIM

Coorientadora: Prof^a. Dra. JANETE MAGALI DE ARAÚJO

RECIFE, 2016

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- E74b Escher, Silvia Katrine Silva.
Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga) da Amazônia e avaliação da atividade antimicrobiana / Silvia Katrine Silva Escher. – 2016.
197 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Antibiótico. 2. Streptomyces. 3. Amazônia. 4. Candida albicans. I. Amorim, Elba Lúcia Cavalcanti de (Orientadora). II. Título.
- 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-033)

SILVIA KATRINE SILVA ESCHER

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE
Aniba parviflora Syn *Fragans* (Macacaporanga) DA AMAZÔNIA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas

Aprovado em 04/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Norma Buarque de Gusmão (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Manoella de Souza Lima (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Ivone Antônia de Souza (Examinadora Interna)

Prof. Dr. Sebastião João De Melo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice - Reitora

Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira

Pró-Reitor para assuntos de Pesquisas e Pós-Graduação

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice - Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antônio Rodolfo de Faria

Vice - Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Coordenador do Programa de Pós - Graduação em Ciências Farmacêuticas

Almir Gonçalves Wanderley

Vice - Coordenadora do Programa de Pós - Graduação em Ciências Farmacêuticas

Rafael Matos Ximenes

Dedico este trabalho a minha família, em retribuição pelo apoio, incentivo e compreensão pela minha ausência nos momentos em família em que tive que me dedicar a minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as boas energias que projetaram em mim a força, inspiração e ânimo, abrindo as portas para que tudo fosse possível.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por ter concedido a realização deste curso.

Às queridas Profa. Dra. Elba Lucia Cavalcanti de Amorim e Profa. Dra. Janete Magali de Araújo pela orientação realizada nesta trajetória acadêmica, sempre entendendo minhas limitações pessoais e me auxiliando a contornar as adversidades.

Aos meus queridos alunos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará, por acreditarem no meu trabalho e estarem sempre ao meu lado crescendo junto nesta jornada.

À Profa. Tsai Siu Mui e Juliane Karine Ishida do CENA-USP, Centro de Energia Nuclear e Agricultura da Universidade de São Paulo, pela colaboração na realização das análises moleculares.

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT) e Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA), uma família nova que ganhei em Recife, que me ajudaram a superar as dificuldades diárias e compartilhamento de conhecimento.

Ao amigo Raphael Carlos Ferrer de Santana por toda ajuda e incentivo durante os momentos mais difíceis que passei longe da minha família.

À Nerilin e equipe da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, sempre tão sensíveis e solícitos em resolver todas as questões burocráticas.

À todos os professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por colaborarem direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos e familiares que sempre demonstraram confiança e orgulho pelo trabalho que desenvolvo.

*“Todos esses que aí estão
atravancando meu caminho,
Eles passarão...
Eu passarinho!”*

Mário Quintana

RESUMO

As Actinobactérias são representantes de um grupo extremamente diverso de bactérias Gram-positivas filamentosas com alto conteúdo de citosina e guanina (G+C) no seu DNA que pertencem à ordem *Actinomycetales*. Seu metabolismo é extremamente rico e, frequentemente acompanhado pela produção de metabólitos secundários de extrema diversidade química e ação biológica, especialmente antimicrobiana. No presente trabalho foram isoladas actinobactérias presente na rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *A. fragans* e avaliado a atividade antimicrobiana do extrato bruto obtido a partir da fermentação submersa em meio M1 e MPE. O potencial antimicrobiano foi avaliado em duas etapas sendo a primeira, por meio da técnica de bloco de gelose frente a micro-organismos de interesse clínico e ambiental, e na segunda etapa, foi realizado a fermentação submersa nos Meio para produção de euromicina (MPE) e MPE modificado (M1), sob agitação contínua por 168h para obtenção dos metabólitos secundários. O líquido fermentado foi testado a cada 24h para avaliação da sua bioatividade pelo método de difusão em disco. Os metabólitos bioativos foram extraídos com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila a partir do líquido metabólico em pH 2,0, pH 6,5 e pH 9,0. Posteriormente foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) do extrato mais ativo através da técnica de microdiluição em caldo, e também foi realizada a caracterização química preliminar por cromatografia em camada delgada (CCD). Todas as 11 linhagens isoladas foram identificadas através de análise micromorfológica e a partir do RNAr 16S como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Os isolados MPO4, MPO9, MPO10 e MPO11 não foram selecionadas para obtenção dos metabólitos secundários, pois não apresentaram efeito antagônico contra os micro-organismos teste. Os metabólitos antimicrobianos foram produzidos a partir de 24h da fermentação apresentando halos de inibição variável entre as linhagens. O extrato de hexano obtido em meio M1 apresentou ação fungicida para *C. albicans* a 78,1 µg/mL e *C. krusei* a 312,5 µg/mL. Na prospecção química foram identificados metabólitos secundários da classe das xantinas, compostos fenólicos, triterpenos e esteroides, derivados antracênicos e cumarinas.

Palavras-chaves: Antibiótico. *Streptomyces*. Amazônia. *Candida albicans*.

ABSTRACT

Actinobacteria are representative of an extremely diverse group of filamentous gram-positive bacteria with high content of guanine and cytosine (G + C) in its DNA belonging to the order Actinomycetales. Your metabolism is extremely rich and often accompanied by the production of secondary metabolites of extreme chemical and biological diversity action, especially antimicrobial. In the present study were isolated actinomycetes present in the rhizosphere of *Aniba parviflora* Syn A. fragrans and evaluated the antimicrobial activity of the crude extract obtained from the submerged fermentation on medium for euromicin production (MPE) and MPE modified. The antimicrobial potential was assessed in two stages, with the first through the technique of agar block against micro-organisms from clinical and environmental interest, and second stage, the submerged fermentation was carried out in medium M1 and MPE in continuous agitation for 168 h to obtain the secondary metabolites. The fermented liquid was tested every 24 hours to evaluate their bioactivity by disk diffusion method. Bioactive metabolites were extracted with the solvents hexane, chloroform and ethyl acetate from metabolic liquid at pH 2.0, pH 6.5 and pH 9.0. Posteriously been determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of most active extract by the broth microdilution technique, and it was also performed preliminary chemical characterization by thin layer chromatography (TLC). Of the 11 strains isolated, 10 were identified through micromorphological analysis and RNAr16S as belonging to the genus *Streptomyces*. Strain MPO4, MPO9, MPO10 and MPO11 were not selected for obtaining metabolites because they didn't have antagonistic effect against test microorganisms. The antimicrobial metabolites were produced at the fermentation 24h with variable sitting inhibition halos between the strains. The hexane extract obtained in medium M1 showed fungicidal action for *Candida albicans* to 78.1 mg / mL and *Candida krusei* to 312.5 mg / mL. In chemical prospecting of secondary metabolites have been identified xanthine, phenolic compounds, triterpenes and steroids, antracênicos derivatives and coumarins.

Keywords: Antibiotic. *Streptomyces*. Amazon. *Candida albicans*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antibióticos produzidos por <i>Streptomyces</i> spp.	30
Tabela 2 - Relação dos micro-organismos teste utilizados no ensaio antimicrobiano.	49
Tabela 3 - Aspectos Macroscópicos da linhagem MPO1 cultivada em diferentes meios de cultura.	55
Tabela 4 - Característica macroscópica da linhagem MPO2 em diferentes meios de cultura.	56
Tabela 5 – Características macroscópicas da linhagem MPO3 cultivada em diferentes meios de cultura.	57
Tabela 6 - Características macroscópicas da linhagem MPO4 cultivada em diferentes meios de cultura.	58
Tabela 7 - Características macroscópicas da linhagem MPO5 cultivada em diferentes meios de cultura.	59
Tabela 8 - Características macroscópicas da linhagem MPO6 cultivada em diferentes meios de cultura.	60
Tabela 9 - Características macroscópicas da linhagem MPO7 cultivada em diferentes meios de cultura.	61
Tabela 10 - Características macroscópicas da linhagem MPO8 cultivada em diferentes meios de cultura.	62
Tabela 11 - Características macroscópicas da linhagem MPO9 cultivada em diferentes meios de cultura.	64
Tabela 12 - Características macroscópicas da linhagem MPO10 cultivada em diferentes meios de cultura.	65
Tabela 13 - Características macroscópicas da linhagem MPO11 cultivada em diferentes meios de cultura.	66
Tabela 14 - Dados de identificação molecular das linhagens de actinobactérias.	74
Tabela 15 - Utilização de fontes de Carbono pelas linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>A. Fragans</i> (macacaporanga).	76
Tabela 16 – Utilização de fontes de nitrogênio pelas linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>A. Fragans</i> (macacaporanga).	77
Tabela 17 – Avaliação de crescimento das linhagens de actinobactérias em diferentes concentrações de NaCl.	79
Tabela 18 - Características bioquímicas das actinobactérias isoladas de solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>A. Fragans</i> (Macacaporanga).	81
Tabela 19 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de amilase.	82
Tabela 20 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de Caseinase.	84

Tabela 21 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de lipase.	85
Tabela 22 - Valores dos halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de esterase.	86
Tabela 23 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de pectinase.	88
Tabela 24 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de hemólise.	92
Tabela 25 - Determinação do índice enzimático (IE) das linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>A. Fragans</i> (Macacaporanga).	93
Tabela 26 - Atividade antimicrobiana das actinobactérias isoladas de solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>A. Fragans</i> (Macacaporanga).	95
Tabela 27 - Antibiógrama das linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>A. Fragans</i> (Macacaporanga).	100
Tabela 28 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. MPO1 nos meios M1 e MPE.	102
Tabela 29 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. MPO2 nos meios M1 e MPE.	104
Tabela 30 - Halos de inibição (mm) para <i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i> do líquido de <i>Streptomyces</i> sp. MPO2 .	105
Tabela 31 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. MPO3 nos meios M1 e MPE.	106
Tabela 32 - Halos de inibição (mm) de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i> frente ao líquido de <i>Streptomyces</i> sp. MPO3 fermentado nos meios M1 e MPE.	107
Tabela 33 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. MPO5 nos meios M1 e MPE.	108
Tabela 34 - Halos de inibição (mm) de <i>Candida albicans</i> e <i>Fusarium</i> sp. frente ao líquido de <i>Streptomyces</i> sp. MPO5 fermentado nos meios M1 e MPE.	109
Tabela 35 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de <i>Microbacterium xylanilyticum</i> MPO6 nos meios M1 e MPE.	110
Tabela 36 - Halos de inibição (mm) de <i>Candida albicans</i> frente ao líquido metabólico de <i>Microbacterium xylanilyticum</i> MPO6.	111
Tabela 37 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. MPO7 nos meios M1 e MPE.	112
Tabela 38 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. MPO8 nos meios M1 e MPE.	114
Tabela 39 - Halos de inibição (mm) de <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Candida albicans</i> do líquido fermentado de <i>Streptomyces</i> sp. MPO8.	114
Tabela 40 - Atividade antimicrobiana dos extratos brutos na concentração de 10 mg/mL contra <i>Candida albicans</i> .	119

Tabela 41 - Atividade antimicrobiana dos extratos brutos na concentração de 10 mg/mL contra <i>Candida krusei</i> .	119
Tabela 42 - Atividade antimicrobiana dos extratos brutos na concentração de 10 mg/mL contra <i>Rhizoctonia solani</i> .	119
Tabela 43 - Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos contra <i>Candida albicans</i> .	120
Tabela 44 - Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos contra <i>Candida krusei</i> .	121
Tabela 45 - Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de <i>Streptomyces</i> sp. MPO8 contra <i>Rhizoctonia solani</i> .	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidade micromorfológica de <i>Streptomyces</i> .	29
Figura 2 - <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>fragans</i> .	38
Figura 3 - Mapa de coordenadas geográficas do ponto de coleta do solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>fragans</i> (Macacaporanga).	43
Figura 4 - Linhagem MPO1 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	55
Figura 5 - Linhagem MPO2 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3; 4. ALA. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	56
Figura 6 - Linhagem MPO3 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3; 4. ISP4; 5.ALA; 6. SDA; 7. BDA; 8. TSA; 9. AN. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	57
Figura 7 - Linhagem MPO4 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	58
Figura 8 - Linhagem MPO5 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP2; 2. ISP3; 3. ISP4. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	59
Figura 9 - Linhagem MPO6 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1. ISP1; 2. ISP2; 3. ISP5. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	60
Figura 10 - Linhagem MPO7 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	62
Figura 11 - Linhagem MPO8 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP2; 2. ISP3; 3. ISP5. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	63
Figura 12 - Linhagem MPO9 nos diferentes meios de cultura após 7 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP2; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	65
Figura 13 - Linhagem MPO10 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	66
Figura 14 - Linhagem MPO11 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.	67
Figura 15 - Crescimento das linhagens de actinobactérias MPO isoladas de solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>A. Fragans</i> (Macacaporanga).	68

Figura 16 - Actinobactérias isoladas de solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>A. Fragans</i> (Macacaporanga) cultivadas em meio ISP2 após 14 dias à 37°C. Lupa, aumento de 40 x. 1.a. MPO1; b. MPO3; c. MPO4; d. MPO5; e. MPO6; f. MPO7; g. MPO8; h. MPO9; i. MPO10; j. MPO11. Escala 10µm.	69
Figura 17 - Microcultivo das linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>Fragans</i> (Macacaporanga), após 14 dias de crescimento à 37° C. a. MPO1, b. MPO2, c. MPO3.	70
Figura 18 - Cadeia de esporos simples flexível das linhagens. a MPO2; b. MPO4; c. MPO8.	71
Figura 19 - Microscopia óptica mostrando a cadeia de esporos. a. MPO1; b. MPO3; c. MPO5; d. MPO7; e. MPO11.	72
Figura 20 - Microscopia óptica mostrando aspectos microscópicos de <i>Microbacterium</i> a. MPO6. <i>Streptomyces</i> . b. MPO9, c. MPO10.	73
Figura 21 - Substratos evidenciando a formação de colônias das linhagens de actinobactérias. a. D-sacarose; b. lactose; c. L-arabnose.	78
Figura 22 - Substratos evidenciando a formação de colônias das linhagens de actinobactérias. a. L-cisteína; b. L-histidina; c. L-glutamina.	78
Figura 23 - Linhagens de actinobactérias produtoras de amilase. a. <i>Streptomyces</i> sp. MPO4; b. <i>Streptomyces</i> sp. MPO9.	82
Figura 24 - Actinobactérias produtoras de caseinase. a. <i>Streptomyces</i> sp. MPO3, b. <i>Streptomyces</i> sp. MPO4, c. <i>Streptomyces</i> sp. MPO8.	84
Figura 25 - Linhagens de actinobactérias produtoras de lipase. a. MPO2, b. MPO4, c. MPO6.	85
Figura 26 - Linhagens de actinobactérias produtoras de esterase. a. MPO1, b. MPO2, c. MPO6.	85
Figura 27 - Linhagens de actinobactérias produtoras de pectinase. a. MPO1; b. MPO4, c. MPO6.	88
Figura 28 - Linhagens de actinobactérias produtoras de L-glutaminase. a. <i>Streptomyces</i> sp. MPO5, b. <i>Microbacterium xylanilyticum</i> MPO6, c. <i>Streptomyces</i> sp. MPO7, d. <i>Streptomyces</i> sp. MPO8.	89
Figura 29 - Actinobactérias produtoras de hemólise em Meio Agar sangue. a. <i>Streptomyces</i> sp. MPO1, b. <i>Streptomyces</i> sp. MPO3, c. <i>Streptomyces</i> sp. MPO4, d. <i>Streptomyces</i> sp. MPO7, e. <i>Streptomyces</i> sp. MPO8.	92
Figura 30 - Atividade antimicrobiana de <i>Streptomyces</i> sp. MPO1. a. <i>Staphylococcus aureus</i> ; b. <i>S. saprophyticus</i> ; c. <i>S. epidermidis</i> ; d. <i>Salmonella enteritidis</i> ; e. <i>S. liquefaciens</i> ; f. <i>Serratia</i> sp.	96
Figura 31 - Atividade antimicrobiana. a. <i>Streptomyces</i> sp. MPO2 frente à <i>Candida albicans</i> ; b. <i>Streptomyces</i> sp. MPO1 contra <i>Candida krusei</i> ; c. <i>Microbacterium xylanilyticum</i> MPO6 contra <i>C. albicans</i> ; d. <i>Streptomyces</i> sp. MPO5 contra <i>Candida albicans</i> .	97
Figura 32 - Atividade antimicrobiana contra <i>Rhizoctonia solani</i> . a.	97

<i>Streptomyces</i> sp. MPO7; b. <i>Streptomyces</i> sp. MPO8.	
Figura 33 – Biomassa da fermentação de <i>Streptomyces</i> sp.MPO1 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.	102
Figura 34 - Produção de metabólitos antifúngicos da linhagem MPO1 em meio M1 e MPE durante 168h de fermentação.	103
Figura 35 - Biomassa da fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. MPO2 em meio M1 e MPE.	104
Figura 36 - Biomassa da fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. MPO2 em meio M1 e MPE.	105
Figura 37 – Biomassa da fermentação de <i>Streptomyces</i> sp.MPO3 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.	106
Figura 38 - Produção de metabólitos antifúngicos de <i>Streptomyces</i> sp. MPO3 em meio M1 e MPE durante 168h de fermentação.	107
Figura 39 – Biomassa da fermentação de <i>Streptomyces</i> sp.MPO5 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.	108
Figura 40 - Produção de metabólitos antifúngicos de <i>Streptomyces</i> sp. MPO5 em meio M1 e MPE durante 96h de fermentação.	109
Figura 41 – Biomassa da fermentação de <i>Microbacterium xylanyliticum</i> MPO6 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.	110
Figura 42 - Produção de metabólitos antifúngicos de <i>Microbacterium xylanyliticum</i> MPO6 em meio M1 e MPE durante 168h de fermentação.	111
Figura 43 – Biomassa da fermentação de <i>Streptomyces</i> sp.MPO7 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.	112
Figura 44 - Produção de metabólitos antifúngicos de <i>Streptomyces</i> sp. MPO7 em meio M1 e MPE durante 96h de fermentação.	113
Figura 45 – Biomassa da fermentação de <i>Streptomyces</i> sp.MPO8 em meio M1 e MPE.	114
Figura 46 - Produção de metabólitos antifúngicos de <i>Streptomyces</i> sp. MPO8 em meio M1 e MPE durante 168h de fermentação.	115
Figura 47 - Rendimento dos extratos brutos de <i>Streptomyces</i> sp. MPO3 obtido através de extração do líquido metabólico de M1 em pH 2, pH 5,79 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.	116
Figura 48 - Rendimento dos extratos brutos de <i>Streptomyces</i> sp. MPO2 obtido através de extração do líquido metabólico de MPE em pH 2, pH 7,56 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.	116
Figura 49 - Rendimento dos extratos brutos de <i>Streptomyces</i> sp. MPO5 obtido através de extração do líquido metabólico de MPE em pH 2, pH 5,55 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.	117
Figura 50 - Rendimento dos extratos brutos de <i>Microbacterium xylanyliticum</i> MPO6 obtido através de extração do líquido	118

metabólico de MPE em pH 2, pH 7,18 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.

- Figura 51** - Rendimento dos extratos brutos de *Streptomyces* sp. MPO8 118
obtido através de extração do líquido metabólico de MPE em pH 2, pH 8,37 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.
- Figura 52** - Placa de ensaio da CMI dos Extratosde MPO3 contra *Candida albicans*. C- (Controle de esterilidade do meio de cultura), C+ (Nistatina 64 µg / mL), C (Controle de viabilidade do inóculo). 121

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Actinobactérias	25
2.2	Antibióticos	29
2.3	Mecanismos de ação dos Antibióticos	32
2.4	Resistência bacteriana	34
2.5	Mecanismos de resistência	35
2.6	<i>Aniba parviflora</i> Syn. <i>A. Fragans</i> (Macacaporanga)	37
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo Geral	41
3.2	Objetivos Específicos	41
4	MATERIAL e MÉTODOS	42
4.1	Local de coleta do material	43
4.2	Isolamento	43
4.3	Identificação morfológica	44
4.3.1	Caracterização Macromorfológica – Cultivo	44
4.3.2	Caracterização micromorfológica - Microcultivo	44
4.4	Identificação Molecular	45
4.4.1	Extração de DNA bacteriano	45
4.4.2	Condições da PCR	45
4.4.3	Sequenciamento, análise e anotação das sequências	45
4.5	Características Bioquímica e Fisiológica	46
4.5.1	Produção de Proteases	46
4.5.2	Produção de amilase	47
4.5.3	Produção de Catalase	47
4.5.4	Produção de Lipase	47
4.5.5	Produção de Pectinase	47
4.5.6	Produção de L-glutaminase	48
4.5.7	Atividade hemolítica	48
4.6	Avaliação de Atividade Antimicrobiana	48
4.7	Obtenção de metabólitos secundários	50
4.7.1	Fermentação submersa	50
4.8	Extração do Antibiótico	50
4.9	Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de hexano, clorofórmio e acetato de etila	51
4.9.1	Difusão em disco	51
4.9.2	Avaliação da Concentração mínima inibitória (CMI)	51
4.10	Prospecção química preliminar do extrato bruto mais ativo	52
4.11	Análise estatística	52
5.	RESULTADOS e DISCUSSÃO	53
5.1	Obtenção das linhagens de actinobactérias	54
5.2	Caracterização macromorfológica	54
5.3	Caracterização micromorfológica	70
5.4	Análise molecular	74
5.5	Utilização de fontes de Carbono e Nitrogênio	75
5.6	Crescimento em diferentes concentrações de NaCl	79
5.7	Características bioquímicas e fisiológicas das actinobactérias isoladas	80
5.8	Atividade antimicrobiana	94

5.9	Perfil de sensibilidade a antimicrobianos	99
5.10	Curva de produção de metabólitos secundários antimicrobianos	101
5.11	Obtenção do Extrato bruto	115
5.12	Atividade antimicrobiana dos extratos brutos	119
5.12.1	Ensaio de Difusão em Disco	119
5.12.2	Concentração mínima inibitória – CMI	120
5.13	Rendimento do extrato bruto X Atividade do extrato	122
5.14	Prospecção química do extrato bruto	123
6.	CONCLUSÃO	124
	REFERÊNCIAS	126
	APÊNDICE (S)	141
	APÊNDICE A. Carta de aceite. Revista Brasileira de Farmácia.	142
	APÊNDICE B. Carta de aceite. African Journal of Microbiology Research.	143
	ANEXO (S)	144
	ANEXO A. Composição dos meios de cultura.	145
	ANEXO B. Dados de nomenclatura inicial dos Isolados de actinobactérias de solo de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>A. Fragans</i> (Macacaporanga).	146
	ANEXO C. Linhagem MPO1 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C.	146
	ANEXO D. Linhagem MPO2 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C.	147
	ANEXO E. Linhagem MPO3 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C.	148
	ANEXO F. Linhagem MPO4 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C.	149
	ANEXO G. Linhagem MPO5 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C.	149
	ANEXO H. Linhagem MPO6 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C.	150
	ANEXO I. Linhagem MPO7 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C.	151
	ANEXO J. Linhagem MPO8 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C.	152
	ANEXO K. Linhagem MPO9 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C.	153
	ANEXO L. Linhagem MPO10 nos diferentes meios de cultura após 7 dias de incubação à 37°C.	154
	ANEXO M. Linhagem MPO11 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C.	155
	ANEXO N. Microcultivo das linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizósferico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>Fragans</i> (Macacaporanga).	156
	ANEXO O. Linhagens de actinobactérias produtoras de amilase.	156
	ANEXO P. Actinobactérias produtoras de caseinase.	157
	ANEXO Q. Actinobactérias produtoras de hemólise em Meio Agar sangue.	157
	ANEXO R. Linhagens de actinobactérias produtoras de L-glutaminase.	157
	ANEXO S. Artigo publicado na Revista Brasileira de Farmácia.	158
	ANEXO T. Artigo publicado na Revista Brazilian Journal of Pharmaceuticals Sciences.	171
	ANEXO U. Artigo aceito para publicação na African Journal of Microbiology Research.	179

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A produção de compostos bioativos oriundos de bactérias e fungos tem sido descrita desde o início do século XX, sendo as actinobactérias alvo da indústria biotecnológica por serem consideradas uma fonte inesgotável de metabólitos secundários bioativos de estrutura química e ação farmacológica extremamente diversificada (Arasu *et al.*, 2009; Batista *et al.*, 2011).

Estima-se que cerca de 20 à 70% dos antibióticos de origem natural isolados são produzidos por micro-organismos do solo em especial as bactérias do gênero *Streptomyces* (Dastager *et al.*, 2008; CHATER *et al.*, 2010; Adegboye *et al.*, 2012). Além destes antimicrobianos, são também descritos metabólitos com propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes, antivirais, antiparasitárias, anticoagulantes, além de enzimas, sideróforos e vitaminas. Estas bactérias filamentosas produzem também compostos aromáticos como a geosmina, responsável pela produção de odor semelhante ao de terra molhada (MOREIRA, 2006; Minotto, 2014).

Cerca de 200 drogas com atividade antimicrobiana estão disponíveis para terapêutica de doenças de origem microbiana. Deste total, 47 novos antibióticos foram aprovados pelo FDA e *Canada Health Ministry* entre 1983 e 2001, porém, apenas 2 apresentam novo mecanismo de ação. Dos 550 novos medicamentos que estão sendo pesquisados apenas 6 são antimicrobianos (Overbye e Barrett, 2005), o que mostra a pouca disponibilidade de compostos possivelmente ativos contra micro-organismos de interesse clínico, especialmente os multiresistentes.

Fontes naturais pouco exploradas com interações ecológicas que podem resultar na descoberta de compostos quimicamente diversos e biologicamente ativos têm sido consideradas promissoras na busca de novos antibióticos, dos quais os actinomicetos representam o grupo de micro-organismos mais bem sucedido que produzem a maioria dos compostos antimicrobianos. Considerando a biodiversidade amazônica, e ainda, a importância dos micro-organismos presentes nos solos deste bioma reconhecidamente pobre em nutrientes, a busca por este grupo microbiano de interesse biotecnológico apresenta-se como uma estratégia importante para a bioprospecção de novos compostos bioativos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1904, Hiltner, usou pela primeira vez o termo “rizosfera”, definindo-a como a região do solo sob influência das raízes, que vai desde a sua superfície até uma distância de 1 a 3 mm. Estruturalmente a rizosfera divide-se em ectorrizosfera, que é a área externa as raízes, endorrizosfera formada pelos tecidos corticais, e o rizoplane que corresponde a superfície entre a raiz e o solo (MOREIRA, 2006; VASCONCELLOS *et al.*, 2010).

O solo rizosférico tem características bem distintas das áreas do solo distante das raízes. Assim, no solo em repouso, o desenvolvimento dos micro-organismos depende da incorporação da matéria orgânica como fonte de energia. Já na rizosfera ocorre maior concentração de nutrientes orgânicos que provêm das raízes, como por exemplo, os exsudatos radiculares que contém uma miscelânea de compostos como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, vitaminas e outros compostos biologicamente ativos, que favorecem o estabelecimento de comunidades microbianas. Em solos argilosos essa influência limita-se a cerca de 2mm em torno das raízes, podendo ser mais abrangente em solos arenosos ou desérticos (PEREIRA, 2000; MOREIRA, 2006).

A composição dos exsudatos produzidos pelas plantas varia de acordo com as fases do seu desenvolvimento. As plantas podem modificar as características químicas do solo próximo às suas raízes, produzir exsudatos, que alteram a atmosfera radicular através do consumo de O₂ e liberação de CO₂, modificando a absorção seletiva de íons nutritivos além de diminuir a concentração de sais e consumo de H₂O reduzindo a umidade (PEREIRA, 2000; MOREIRA, 2006). Nesta dinâmica, a diversidade de micro-organismos estabelece relações ecológicas, interagindo de formas variadas com a planta, proporcionando efeitos benéficos que resultam em uma vantagem para o desenvolvimento vegetal ou em desvantagens com as doenças provocadas por fitopatógenos.

Cerca de 4 a 10% da superfície da raiz é colonizada por micro-organismos, sendo que os exsudatos e materiais orgânicos estão preferencialmente disponíveis nos orifícios causados por injúrias, junções de células epidérmicas, áreas de células descamadas, mucilagem nas pontas das raízes, os quais são micro-sítios favoráveis para a colonização microbiana (MOREIRA, 2006).

A quantidade de micro-organismos na rizosfera depende da quantidade e da diversidade de compostos orgânicos liberados, bem como do ambiente físico-químico, que

pode exceder mais de 1000 vezes a quantidade de micro-organismos presente no solo não rizosférico. Portanto, à medida que a distância da rizosfera aumenta, a ocorrência de bactérias, actinomicetos e fungos, diminui (MOREIRA, 2006).

Na rizosfera, não há o favorecimento de uma espécie em detrimento a outra, entretanto, estudos demonstram que em plantas cultiváveis como o trigo e soja, bactérias Gram-negativas parecem ser favorecidas pela maior taxa de multiplicação, pela rápida incorporação de aminoácidos adicionados, açúcares solúveis e por serem resistentes aos antibióticos produzidos por outras bactérias, devido o antagonismo entre os micro-organismos rizosféricos. A produção de substâncias inibidoras, como acontece em *Pseudomonas*, ou, ainda, por estas bactérias se destacarem pela maior facilidade de identificação, são alguns fatores que podem influenciar a grande ocorrência destas bactérias em maior número na rizosfera. As baixas tensões de oxigênio, resultantes da intensa atividade respiratória radicular e microbiana, também propiciam a incidência de bactérias anaeróbicas na rizosférica (MOREIRA, 2006).

Fungos que interagem diretamente com a raiz, como por exemplo, fungos micorrízicos e patogênicos, são estimulados e seu crescimento filamentoso bom como quimiotaxia e quimiotrofia positiva proporcionam uma colonização rápida. Os fungos mais estimulados na rizosfera são *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Phoma* e *Gliocladium* (MOREIRA, 2006)

Diversos fatores estão relacionados à inibição dos patógenos ou favorecimento de sua ocorrência. Dentre eles podemos destacar os efeitos causados pelos exsudatos, que podem influenciar na ocorrência de doenças. Tanto os fungos como actinomicetos e bactérias que habitam a rizosfera, excretam enzimas que estimulam o crescimento vegetal, além de antibióticos que podem manter a planta protegida de patógenos (Primavesi, 2002). A influência dos antibióticos no equilíbrio da microbiota rizosférica, está condicionada à atividade dos micro-organismos antagonistas e à ação dos antibióticos produzidos sobre a população microbiana sensível (PEREIRA, 2000).

Os micro-organismos podem estimular a exsudação das plantas e também causar vários efeitos morfológicos e fisiológicos sobre as plantas, como por exemplo, danos aos tecidos radiculares; alterações no metabolismo; utilização de certos componentes dos exsudatos; excreção de enzimas, toxinas e antibióticos, além de alterar a disponibilidade, acessibilidade e assimilação de nutrientes minerais. Estas interações podem ser classificadas em efeitos maléficos e benéficos. Os benéficos são a decomposição e mineralização da matéria orgânica, a fixação biológica de N₂, a amonificação, além da produção de enzimas,

vitaminas, co-fatores e as interações simbióticas com fungos micorrízicos. Já os efeitos maléficos podem ser a redução de sulfato, a produção de compostos inibitórios e a imobilização de nutrientes (PEREIRA, 2000; MOREIRA, 2006).

Alguns micro-organismos rizosféricos tanto benéficos como patógenos, também produzem substâncias Reguladoras do Crescimento de Plantas (SRCP). Na rizosfera que é a área onde ocorre a maior diversidade de actinomicetos, se destaca por ser predominantemente colonizada por este grupo de bactérias mais abundante no solo, os quais estão relacionadas à processos de decomposição da matéria orgânica, simbiose com as raízes e a fixação do nitrogênio (SIQUEIRA e MOREIRA, 2001).

2.1 Actinobactérias

As actinobactérias anteriormente denominadas como actinomicetos pertencem ao domínio *Bacteria*, filo *Actinobacteriae* e classe *Actinobacteria*, que segundo o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2012), compreende 16 ordens, 55 famílias, 240 gêneros e centenas de espécies. Alguns dos gêneros mais importantes são: *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* e *Streptomyces* (VENTURA *et al.*, 2007; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Em geral os actinomicetos apresentam em seu DNA uma faixa de 63-78% de guanina e citosina (GC), esse percentual pode exceder 70% do total de bases nucleotídicas, variando de 51% em *Corynebacteria* e mais de 70% em *Streptomyces* e *Frankia*. As actinobactérias são bactérias Gram-positivas filamentosas que ocorrem em alta frequência em solo rizosférico e seu crescimento é caracterizado pela formação de hifas que se ramificam originando um micélio típico e unicelular durante a fase de crescimento.

A micromorfologia das actinobactérias é diferenciada de acordo com o gênero, podendo apresentar esporos esférico ou bacilar, formando micélio aéreo de coloração variada. O micélio que se desenvolve no interior do substrato, é denominado micélio vegetativo, e tem como função a sustentação e absorção de nutrientes através da liberação de enzimas extracelulares que degradam os compostos utilizados na sua nutrição. O micélio que se projeta na superfície do substrato é chamado micélio aéreo, que apresenta aparência aveludada e constitui o micélio reprodutivo, onde o mesmo se diferencia para formar os corpos de frutificação ou propágulos (HECK, 2007; CHATER *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2011; MAHAJAN e BALACHANDRAN, 2011).

A morfologia das colônias das actinobactérias se assemelha à dos fungos filamentosos, entretanto, elas se diferenciam quanto à estrutura celular procariótica por serem procariotos e possuírem filamentos com diâmetro bem inferior ao dos fungos eucarióticos, apresentando hifas com 0,5 - 1,2 μm de diâmetro. Outra semelhança aos fungos, é que alguns actinomicetos apresentam esporos assexuados que são utilizados para a reprodução. Muitas bactérias do filo *Actinobacteria* possuem alta pleomorfia em sua morfologia. Os gêneros *Corynebacterium*, *Gardnerella* e *Streptomyces*, por exemplo, crescem somente de forma filamentosa extensa muitas vezes ramificados (SIQUEIRA e MOREIRA, 2001; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

A forma filamentosa garante algumas vantagens a esses organismos lhes permitindo criar pontes em espaços sem água entre as partículas de solo para se deslocar até novos sítios nutricionais, proporcionando uma maior relação superfície-volume aumentando sua capacidade de absorver nutrientes e penetração em tecidos e ajudam a secretar enzimas e outros metabólitos. A proximidade do micélio aos substratos possibilita ao micro-organismo secretar apenas uma pequena quantidade de enzima para que a mesma atinja níveis efetivos (CHATER *et al.*, 2010).

A reprodução das actinobactérias pode ocorrer por meio de *fragmentação* em algumas espécies, como no gênero *Nocardia*, na qual as hifas se fragmentam em muitas células baciliformes e cocóides, onde cada uma é capaz de originar um novo micélio. Outras espécies reproduzem-se pela formação de esporos ou conidiósporos como *Streptomyces* e *Estreptosporangio*. Os esporos são produzidos em grande quantidade originando um novo organismo. Mesmo não sendo resistentes ao calor, os conidiósporos e os esporangiósporos são resistentes à dessecação e podem auxiliar na sobrevivência das espécies durante o período de estiagem (PELCZAR JR *et al.*, 2005).

A maioria das Actinobactérias são aeróbias, heterotróficas e habitam naturalmente no solo. Ocorrem em diversas condições do ambiente, produzem diversos metabólitos secundários e colonizam a rizosfera e tecidos internos das plantas. Este grupo de bactérias filamentosas é mais abundante em solos secos e quentes, e raros em solos encharcados, isso porque o desenvolvimento de espécies do gênero *Streptomyces*, por exemplo, é mais favorável em solos alcalinos e neutros do que em solos ácidos. Existe uma maior diversidade de *Streptmomyces* em solos calcários arenosos ou solos recobrimdo rochedos calcários. Evidências sugerem que bactérias deste gênero necessitam para o seu desenvolvimento de um potencial de água menor que várias outras bactérias do solo. O gênero *Streptomyces*

representa 70 a 90% das actinobactérias isolados do solo (SIQUEIRA e MOREIRA, 2001; MADIGAN *et al.*, 2004; CANOVA, 2009).

As actinobactérias são saprófitas, porém algumas poucas espécies são patogênicas ao homem, a animais ou plantas. No solo estas bactérias realizam funções importantes no processo de compostagem, degradando compostos de difícil decomposição como lignina, celulose e outros materiais recalcitrantes, devido à sua capacidade em produzir diversas enzimas lipolíticas, inclusive enzimas de interesse industrial. Outra atividade importante é a fixação de nitrogênio dentro das raízes de plantas lenhosas não leguminosas tais como álamos, como ocorre com o gênero *Frankia* (MADIGAN *et al.*, 2004).

A presença de actinomicetos no solo pode ser detectada pela produção de “geosmina”, que são compostos aromáticos voláteis com cheiro de terra molhada bem característico, que emanam de solos recém arados e nas primeiras chuvas de janeiro (SIQUEIRA 1997). Este odor característico de terra é decorrente de uma série de metabólitos produzidos por representantes do gênero *Streptomyces*. Essas substâncias como os sesquiterpenóides, são compostos por carbono, oxigênio e hidrogênio, com anel insaturado como geosmin que corresponde ao trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol, produzido por *Streptomyces*. Além das Actinobactérias, algumas cianobactérias também produzem geosmina (MADIGAN *et al.*, 2004).

Os metabólitos secundários são compostos produzidos apenas quando cessa o crescimento do micro-organismo produtor e não são essenciais para o seu crescimento e reprodução, ou seja, na fase estacionária de crescimento microbiano. A produção de metabólitos secundários bioativos é uma vantagem competitiva (VERMELHO, BASTOS E BRANQUINHA, 2007; CANOVA, 2009). As actinobactérias, principalmente as do gênero *Streptomyces* são capazes de sintetizar muitos metabólitos secundários bioativos como atividade antibióticas, herbicidas, pesticidas, antiparasitários, além de enzimas como amilases, celulasas, lipases, xilanases (RODRIGUES, BEZERRA NETO e COELHO, 2006).

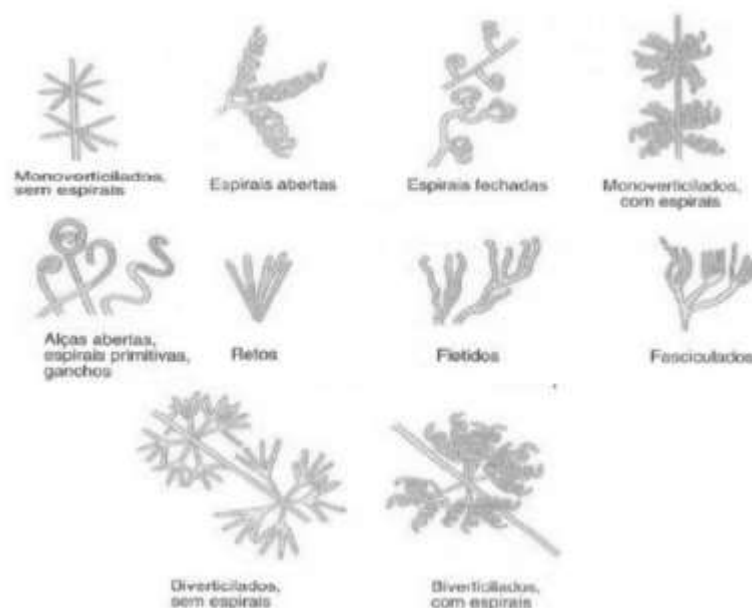
A família Actinomycetaceae é a responsável pela produção da maioria dos antibióticos conhecidos, principalmente o gênero *Streptomyces*, sendo responsável pela produção de 75% dos antimicrobianos utilizados na clínica médica. Portanto, os actinomicetos são micro-organismos que apresentam um grande potencial para a produção de compostos antimicrobianos, sendo uma fonte promissora na busca de novos antibióticos (HECK, 2007).

Streptomyces são bactérias Gram-positivas, que apresentam um complexo ciclo de vida e são conhecidas mais de 500 espécies que podem ocorrer em habitats aquáticos, entretanto, habitam preferencialmente o solo, sendo os solos alcalinos e neutros mais favoráveis ao seu desenvolvimento. Estes micro-organismos apresentam cromossoma linear cujo tamanho varia de espécie para espécie podendo atingir até 9 Mb. A estrutura e o tamanho do genoma refletem a grande diversidade morfológica, bioquímica e as classes dos metabólitos produzidos por *Streptomyces* (MADIGAN *et al.*, 2004; ANTUNES *et al.*, 2013).

Os filamentos de *Streptomyces* em geral apresentam de 0,5-1,0 µm de diâmetro, com comprimento indefinido, e geralmente são desprovidos de paredes transversais, na fase vegetativa. O crescimento ocorre a partir da ponta dos filamentos, acompanhado pela formação de ramificações, de modo que a fase vegetativa corresponde a uma matriz complexa, fortemente entrelaçada, originando um micélio compacto e, posteriormente, uma colônia. À medida que o micélio aéreo se desenvolve os diferentes esporóforos são formados (Figura 1). Os esporóforos são filamentos aéreos característicos que se projetam acima da superfície da colônia. Os esporos de *Streptomyces*, ou conídios, não possuem nenhuma relação com esporos de outras bactérias como ocorre em *Bacillus* e *Clostridium*, visto que, os esporos dos estreptomicetos são produzidos pela formação de paredes transversais multinucleado, com longas cadeias de esporóforos diversificada que é uma característica do gênero *Streptomyces* (MADIGAN *et al.*, 2004).

Algumas das características importantes na classificação de *Streptomyces* são as diferenças na forma e no arranjo dos filamentos aéreos e das estruturas contendo os esporos das várias espécies. Os conídios e esporóforos são geralmente pigmentados, contribuindo para uma coloração específica da colônia em diferentes meios de cultura. Assim, dentre as características que facilitam a identificação das colônias de *Streptomyces* em meio de cultura sólido, podemos destacar a aparência pulverulenta das colônias maduras, sua natureza compacta e coloração diversificada (MADIGAN *et al.* 2004).

Figura 1. Diversidade micromorfológica de *Streptomyces*.



Fonte: (MADIGAN *et al.*, 2004).

2.2 Antibióticos

Os *Streptomyces* produzem diferentes moléculas bioativas com atividade antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias, herbicidas e enzimas, que têm empregos na medicina, na agricultura e também em vários processos biotecnológicos. Cerca de 500 antibióticos diferentes são produzidos por espécies deste gênero sendo que mais de 60 possuem aplicação prática na medicina, veterinária, agricultura e indústria (Tabela 1), como por exemplo, os pertencentes à classe dos aminoglicosídeos, macrolídeos, lipopeptídeos, glicopeptídeos, tetraciclina e estreptograminas (MADIGAN *et al.*, 2004; ALBERTON *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Antibióticos produzidos por *Streptomyces* spp.

Classe química	Antibiótico	Micro-organismo	Ação
Aminoglicosídes	Estreptomina	<i>Streptomyces griseus</i>	Maioria de <i>Bacteria</i> Gram-negativas
	Espectinomicina	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , produtores de penicilinase
	Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Ampla espectro, geralmente utilizado topicamente devido à sua toxicidade
Tetraciclina	Tetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Ampla espectro, Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, riquetsias e clamídias, <i>Mycoplasma</i>
	Clortetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	
Macrolídeos	Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>	Bactérias Gram-positivas, frequentemente utilizado em substituição à penicilina, <i>Legionella</i>
	Clindamicina	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Eficaz contra anaeróbios obrigatórios, especialmente <i>Bacteroides fragilis</i>
Polienos	Nistatina	<i>Streptomyces noursei</i>	Fungos, especialmente em infecções por <i>Candida</i> .
	Anfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i>	Fungos

Fonte: (MADIGAN *et al.*, 2004).

Substâncias com propriedades anti-infecciosas vêm sendo utilizadas pelo homem, de forma empírica, por milhares de anos. Há mais de 2.500 anos, os chineses utilizavam coalhos de soja mofada para tratar infecções de feridas e de bolhas. Outras substâncias como o vinho, a mirra (resina extraída de árvores da família das burseráceas) e sais inorgânicos, comumente eram utilizados por médicos da Grécia antiga no tratamento de feridas, por possuírem propriedades antimicrobianas. As primeiras substâncias empregadas no combate às infecções microbianas foram o mercúrio, para o tratamento da sífilis, e a ipepacuanha, para o tratamento da disenteria amebiana (VERMELHO, BASTOS e BRANQUINHA, 2007).

Apesar da utilização de substâncias para o tratamento de doenças infecciosas desde o século XVII, a quimioterapia, como ciência, só começou com Paul Ehrlich, na primeira década do século XX. Foi ele quem formulou os princípios de toxicidade seletiva, descobriu que existiam relações químicas específicas entre patógenos microbianos e substâncias farmacológicas, o desenvolvimento da resistência microbiana aos mesmos e o papel da terapia combinada. Através dos experimentos de Ehrlich, as arfenaminas passaram a ser utilizadas no tratamento da sífilis, constituindo a primeira quimioterapia planejada (JAWETZ e LEVINSON, 2005).

Louis Pasteur em 1877 foi o primeiro a observar que micro-organismos podiam ser inibidos por outros micro-organismos quando em um meio de cultura sólido semeado com *Bacillus anthracis*, observou a inibição do crescimento deste por um micro-organismo contaminante.

Em 1928 Alexander Fleming observou a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* em uma área que circundava a colônia de um bolor que havia contaminado a placa de Petri. Este bolor foi identificado como *Penicillium notatum*, e seu composto ativo isolado logo em seguida, foi chamado de penicilina (VERMELHO, BASTOS e BRANQUINHA, 2007; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Após o isolamento, purificação e a produção da penicilina em grande escala, veio em seguida o desenvolvimento da estreptomicina, tetraciclina, clorafenicol e de muitos outros agentes antimicrobianos. Originalmente essas substâncias foram isoladas a partir de filtrados de meios de fermentação de seus respectivos produtores (JAWETZ e LEVINSON, 2005).

Atualmente é conhecido que muitos micro-organismos produzem determinados compostos que em pequenas quantidades, são capazes de inibir ou eliminar o crescimento de outras espécies de micro-organismos. Estas substâncias produzidas biologicamente e que possuem capacidades antimicrobianas, foram chamadas de antibióticos (VERMELHO, BASTOS e BRANQUINHA, 2007).

Os micro-organismos apresentam grande potencial biotecnológico devido à variedade de moléculas resultantes do metabolismo secundário. Grande parte dos produtos utilizados atualmente na terapia humana, animal e na agricultura, são produzidas por fermentação microbiana ou são derivados de modificações químicas como, por exemplo, antibióticos, antitumorais, antifúngicos, imunossuppressores, inibidores enzimáticos, antiparasitários, herbicidas, inseticidas e promotores de crescimento (DE MANGUEZAIS, 2008).

A maioria dos antibióticos são produzidos por micro-organismos que fazem a síntese total ou parcial da molécula e, neste caso, são concluídos em laboratório, os chamados antibióticos semi-sintéticos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004). Desta forma, alguns antibióticos deixaram de ser produzidos *in vivo* e passaram a ser sintetizados apenas *in vitro*.

Os antibióticos produzidos por alguns micro-organismos podem ser modificados em laboratório através da adição de grupos químicos ao núcleo principal da molécula, tornando-os mais efetivos e ampliando o seu espectro de ação. Portanto, essas substâncias são consideradas semi-sintéticas, como por exemplo, a maioria das penicilinas e cefalosporinas usadas (VERMELHO, BASTOS e BRANQUINHA, 2007). Uma grande vantagem dos produtos de origem biológica em relação aos compostos de origem sintética, é que através da biotecnologia é possível acessar genes que codificam enzimas capazes de produzir e inativar estes produtos naturais (SILVA, 2004).

A maioria dos antibióticos usados clinicamente é produzida por micro-organismos presentes no solo e pertencentes aos gêneros *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, e alguns por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*, apresentando mecanismo e espectro de ação diversificado. Quimioterápicos e antibióticos podem ter ação antibacteriana, antifúngica, antiviral e ainda antitumoral (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004; VERMELHO, BASTOS e BRANQUINHA, 2007).

2.3 Mecanismos de ação dos Antibióticos

A toxicidade seletiva é uma das principais características desejáveis em um quimioterápico para que este possa ser utilizado clinicamente, ou seja, deve ser tóxico para o micro-organismo alvo, mas não para o hospedeiro. Os antibióticos e os quimioterápicos agem de diferentes formas na célula microbiana sendo classificados como bacteriostático ou

fungistático, inibindo o crescimento bacteriano ou fúngico, ou bactericida ou fungicida, causando a morte desses micro-organismos. Os antibacterianos são normalmente divididos nessas duas categorias, mas algumas drogas consideradas bacteriostáticas podem ser bactericidas para determinadas espécies de bactérias. Podemos citar como exemplo o cloranfenicol, que é um excelente agente bacteriostático, mas que funciona como bactericida para *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, e as penicilinas que são drogas bactericidas em certas circunstâncias funcionam como bacteriostáticas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004; VERMELHO, BASTOS e BRANQUINHA, 2007).

Nem todos os quimioterápicos possuem toxicidade seletiva, alguns apresentam certo grau de toxicidade às células do organismo hospedeiro. Esses fármacos apresentam um espectro de ação variado, não existindo, portanto, um antimicrobiano que atue sobre todo e qualquer micro-organismo (VERMELHO, BASTOS e BRANQUINHA, 2007). Os antibacterianos podem interagir na parede da célula bacteriana (estrutura e biossíntese), na membrana citoplasmática (estrutura e função), na síntese de proteínas e síntese de ácidos nucleicos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Muitos antibacterianos atuam inibindo a síntese de peptidoglicano da parede celular bacteriana, tornando-a enfraquecida e ocasionando lise celular. Os antibacterianos mais utilizados que atuam a este nível são os antibióticos β -lactâmicos. A síntese da camada de peptidoglicano pode ser dividida em três etapas: uma ocorrendo no citoplasma, outra na membrana citoplasmática e a terceira, na membrana externa. Os β -lactâmicos agem na terceira etapa, inibindo o crescimento do peptídeoglicano através da interferência na função de várias enzimas que participam da sua síntese final e não somente com a função das transpeptidases como se pensava anteriormente. De forma indireta, esses antibióticos também aumentam a atividade das autolisinas, que seriam substâncias responsáveis pela lise da célula bacteriana (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Os antibióticos que atuam ao nível de membrana plasmática possuem em sua molécula grupamentos básicos (NH_2^+) e uma cadeia lateral de ácido graxo. Quando os antimicrobianos alcançam a membrana citoplasmática bacteriana, o ácido graxo fica mergulhado na parte lipídica e a porção básica permanece na superfície, essa intercalação das moléculas ocasiona a desorganização da membrana, provocando a perda de metabólitos celulares importantes para as bactérias (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Os aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, lincomicina e clindamicina, são antimicrobianos que atuam ao nível dos ribossomos. Os aminoglicosídeos e as tetraciclina inibem a síntese protéica ao se fixarem às subunidades 30S (fração do RNA mensageiro onde é formado o complexo de iniciação da síntese protéica) e os outros antibióticos às subunidades 50S (que juntamente com a subunidade 30S forma o ribossomo 70S) (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

O metronidazol, os derivados quinolônicos e as rifamicidas agem a este nível. O metronidazol ao entrar na célula é degradado pela nitroso-redutase, formando produtos tóxicos que se inserem na molécula de DNA, ocasionando sua quebra (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Pode ocorrer também inibição competitiva, que corresponde à inibição de uma atividade enzimática de um micro-organismo por uma substância denominada antimetabólito, que é semelhante ao substrato normal da enzima. A relação entre o antimetabólito sulfanilamida e o ácido paraminobenzoico (PABA) é um exemplo desse tipo de inibição. Este ácido é o substrato de uma reação enzimática em muitos micro-organismos, reação esta que produz ácido fólico, que é uma vitamina atuante como coenzima na síntese de bases purínicas e pirimidínicas de ácidos nucleicos e de muitos aminoácidos (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

2.4 Resistência bacteriana

A resistência microbiana aos antibióticos tem sido observada desde a década de 1940 com a emergência de micro-organismos resistentes e multiresistentes aos diferentes antibióticos comumente utilizados na terapia humana (Antunes *et al.*, 2013). Em 1930, as sulfonamidas começaram a se empregadas no tratamento da gonorréia, e os gonococos demonstraram sensibilidade ao fármaco ocasionando a cura na maioria dos casos de infecção. Depois de alguns anos, constatou-se que a grande maioria desses micro-organismos adquiriu resistência a sulfonamidas, tornando-se ineficaz na cura da gonorréia. Os meningococos, que até 1962 eram sensíveis às sulfonamidas, também apresentaram cepas resistentes.

Em 1948, observou-se que após o uso em larga escala da penicilina, 65% a 85% dos estafilococos isolados de hospitais eram produtores de β -lactamase, ou seja, resistentes a penicilina G a qual eram sensíveis anteriormente. Estes casos frequentes de resistência à antimicrobianos nos últimos anos, levaram a comunidade científica a buscar novos produtores

de antibióticos, principalmente os de solo como fungos e actinomicetos (JAWETZ e LEVINSON, 2005; HECK, 2007).

A resistência pode ser natural ou adquirida. A natural ou intrínseca, é uma característica determinada pela própria fisiologia ou organização estrutural da espécie bacteriana, e neste caso, todas as amostras são sempre resistentes independentemente do local de isolamento, e essa característica é herdada pelas células. Podemos citar como exemplo a resistência de bactérias Gram-negativas à vancomicina, onde essa resistência ocorre em decorrência da vancomicina exceder o limite de exclusão das porinas presentes na membrana externa da bactéria impedindo consequentemente que o antimicrobiano alcance o alvo destes micro-organismos.

A maioria das bactérias Gram-negativas são mais resistentes do que as Gram-positivas, o que pode ser justificado pela característica morfológica das bactérias Gram-negativas, que possuem uma membrana externa funcionando como uma barreira que impede o acesso da droga ao seu sítio-alvo. Na resistência adquirida somente parte das amostras apresentam resistência, e o número desses indivíduos depende do local de isolamento e da intensidade com que se utiliza o antimicrobiano. Esse tipo de resistência em geral, é ocasionada por mutações genéticas da bactéria ou da aquisição de material genético que codificam genes de resistência (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004; VERMELHO, BASTOS e BRANQUINHA, 2007).

2.5 Mecanismos de resistência

A resistência ocasionada por mutações é geralmente simples, pois atinge apenas um antimicrobiano, isso por que dificilmente uma bactéria sofre mutações simultâneas para dois ou mais antimicrobianos. A resistência mediada por fator R pode ser simples, mas na maioria das vezes é múltipla, ou seja, a bactéria se torna resistente a dois ou mais antimicrobianos, pela presença de genes de resistência para diferentes tipos desses fármacos.

A presença de dois ou mais plasmídios numa mesma bactéria, também contribui para a resistência antimicrobiana. Não é rara a associação desses dois mecanismos de resistência (mutação e plasmídios), numa mesma bactéria, podemos observar este evento em bactérias selecionadas em hospitais, onde a utilização de antimicrobianos é mais intensa (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Vários outros mecanismos podem induzir a resistência bacteriana como a produção de enzimas microbianas que modificam a molécula do antibacteriano tornando-o inativo; a

diminuição da permeabilidade à entrada do antibacteriano na célula; a alteração do sítio-alvo; a síntese de novas enzimas que não sofrem ação do antibacteriano e a expulsão do antibacteriano da célula (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

As bactérias tornam-se resistentes a β -lactâmicos através da produção da β -lactamase que hidrolisa o anel β -lactâmico transformando o antibiótico em um produto inativo (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

A resistência aos aminoglicosídeos pode ser induzida por três mecanismos químicos: alterações de permeabilidade, modificações ribossômicas (ambas mediadas por mutação) e produção de enzimas inativantes (mediada por plasmídio). As mediadas por mutações podem afetar tanto o sítio de ação (ribossomo) como o transporte para o interior da célula, e a resistência ocasionada por plasmídios decorre da produção de enzimas (fosfo-transferases - PT, adenil-transferases - ADT e acetil-transferases - ACT) que tem a capacidade de modificar as moléculas dos aminoglicosídeos, reduzindo sua capacidade de fixação aos ribossomos, além de prejudicar o transporte para o interior da célula (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

A resistência as tetraciclinas ocorre pela aquisição de plasmídios de resistência, devido a presença de proteínas chamadas Tet (Tet A, B, C e D), que após formadas, localizam-se na membrana citoplasmática provocando a saída quase que imediata do antibiótico da célula (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

A resistência a cloranfenicol é ocasionada pela enzima cloranfenicol-acetil-transferase (CACT) que acetila o antimicrobiano provocando a perda da sua afinidade pelo seu alvo. Algumas bactérias Gram-negativas também apresentam como mecanismo de resistência a perda de permeabilidade (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Para a eritromicina resistência é originada por mutação ou de plasmídios de resistência. Algumas bactérias como o *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, possuem alterações na proteína L15 da subunidade 50S do ribossomo, causada por mutação. A resistência por plasmídios decorre da metilação do RNA ribossômico (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

A resistência a rifamicinas e quinolônicos se deve a mutações que alteram as enzimas RNA polimerases e girases, que são inibidas respectivamente pelas rifamicinas e quinolônicos. As mutações fazem com que estas enzimas não mais se combinem com os dois antimicrobianos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

As bactérias podem tornar-se resistentes às sulfas por mutação, podendo gerar uma superprodução de PABA e a alterações estruturais de enzimas que participam da síntese do

ácido tetraidrofólico, ou pela aquisição de plasmídios de resistência, que codificam uma diidropteroato sintase, com a qual as sulfonamidas não se combinam. Apesar da capacidade das bactérias em tornar-se resistentes ao trimetoprim por mutação, o mecanismo mais importante é por meio de plasmídio que codifica a síntese da diidrofolato redutase, resistente a ação do fármaco (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Os *Enterococcus* resistentes a antimicrobianos como vancomicina e teicoplanina, são capazes de produzir uma enzima que permite que o estágio final da ligação, anteriormente bloqueada pela ação dos antimicrobianos, seja agora concluído (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Neste contexto de multirresistência, torna-se cada vez mais necessário a prospecção de novos compostos biológicos efetivos frente aos micro-organismos que vem manifestando resistência à terapia antimicrobiana padrão.

2.6 *Aniba parviflora* Syn. *A. Fragans* (Macacaporanga)

A família Lauraceae compreende 49 gêneros e cerca de 3.000 espécies, constituída em sua maioria por árvores e arbustos. Sua distribuição ocorre em regiões tropicais e subtropicais, com alta diversidade de espécies no norte da América do Sul, sudeste da Ásia e Madagascar (MADRINÁN, 2004). Aproximadamente 22 gêneros e cerca de 390 espécies ocorrem no Brasil, com alta diversidade nas florestas pluviais, nas restingas e no cerrado (BARROSO et al., 2002).

É considerada uma das famílias mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta, sendo morfológicamente semelhante a outras famílias como Calycanthaceae, Idiospermaceae e Hernandiaceae (CRONQUIST, 1978). O seu nome origina do gênero *Laurus* L., que em latim significa louro e de acordo com a literatura, o nome corresponde a *laus*–louvor, como referência às coroas de louro que eram oferecidas aos heróis em louvor a atos de bravura (ALVES et al., 2007).

Espécies da família Lauraceae apresentam folhas alternas, inteiras, peninérveas ou 3-5 nérveas, glabras ou pilosas, inflorescências paniculadas e fruto do tipo baga, drupa ou núcula. São facilmente reconhecidas em campo pelas características do tronco liso e lenticelado e o odor de óleo volátil ao corte do tronco e folhas (BARROSO, 1991), característica esta que desperta grande interesse da indústria cosmética por apresentar espécies aromáticas de valor econômico.

Espécies do gênero *Aniba*, pertencem à família Lauraceae e são conhecidas por apresentar o lenho e as folhas aromáticas e pela constituição dos seus óleos essenciais, amplamente utilizados na indústria de perfumaria. A espécie que mais se destaca é *Aniba rosaeodora* (pau-rosa), que contém o linalol como componente majoritário do seu óleo essencial, muito utilizado como fixador (DE MELO *et al.*, 2006).

O óleo essencial pode ser encontrado em todos os seus órgãos, com diferença quanto à composição, dependendo do órgão onde são produzidos ou armazenados (MARQUES, 2001). Aproximadamente 40 espécies do gênero *Aniba* produzem óleos essenciais diferentes quanto à natureza química, classificados em três grupos: o grupo do linalol (*A. rosaeodora* Ducke, *A. duckei* Kosterm.); o grupo do benzoato, (*A. fragrans* Ducke, *A. firmula* (Nees et Mart.) Mez, *A. gardneri* (Meissn.) Mez, *A. burchellii* Kosterm., *A. parviflora* (Meissn.) Mez, *A. permollis* (Nees), Mez, *A. guianensis* Aubl.) e o grupo de alilbenzeno (*A. canelilla* (H.B.K.) Mez, *A. hostmanniana* (Ness) Mez, *A. pseudocoto* (Reesby) Kosterm.) (MORAES, 1977).

Botanicamente confundida com o Pau-rosa no estado jovem, a Macacaporanga (*Aniba parviflora*, Syn *fragrans*), é uma árvore de médio porte nativa da Amazônia (Figura 2), distribuída nas localidades de Santarém, Faro e médio rio Tapajós, encontrada nos arredores de igarapés (REVILLA, 2002).

Figura 2 - *Aniba parviflora* Syn *fragrans*.



Fonte: BARATA, 2010.

Seu óleo essencial pode ser obtido a partir das folhas e galhos, apresentando em média 35% de linalol na sua composição. Apresenta grande aplicação na indústria cosmética, uma vez que apresenta aroma forte e agradável, porém, devido a sua rara ocorrência, dificulta sua exploração (MARQUES, 2001). Seus ramos e a madeira, quando secos e transformados em pó, são utilizados como saches aromatizantes (CORREA E PENNA, 1974), e em “banhos de cheiro” (RODRIGUES, 1989).

Por apresentar grande semelhança morfológica com a sua congênere *Aniba rosaeodora*, a Macacaporanga tem sido explorada na região de Santarém para a obtenção de mudas, já que possuem grande similaridade. Estudos fitoquímicos mostram que embora haja uma similaridade na composição do OE de *Aniba rosaeodora* (Pau-rosa) e *Aniba parviflora* (Macacaporanga), esta possui menor teor de linalol (MAIA *et al.*, 2001), entre outras diferenças, que podem ser percebidas até mesmo em análise sensorial (TRANCHIDA *et al.*, 2008).

São descritas diversas classes de metabólitos secundários bioativos presentes no óleo essencial e extratos orgânicos de *Aniba parviflora* Syn fragans como taninos, compostos fenólicos de grande interesse para a indústria alimentícia devido sua ação antimicrobiana, anticarcinogênica e antioxidante (MONTEIRO *et al.*, 2005); saponinas, devido sua ação imunoadjuvante e hemolítica; e flavonoides, compostos aromáticos com variada ação biológica, entre as quais ação vasoprotetora, anti-inflamatória, antitumoral, e antioxidante (MONTEIRO *et al.*, 2005; SOUZA, MELLO e LOPES, 2011).

3. OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar Actinobactérias da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga) da Amazônia e avaliar sua atividade.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar Actinobactérias dos solos selecionados.
- Selecionar Actinobactérias com atividade antimicrobiana contra fitopatógenos e patógenos humanos.
- Caracterizar taxonomicamente as Actinobactérias com melhor desempenho na atividade antimicrobiana.
- Determinar as classes dos compostos bioativos produzidos pelas Actinobactérias selecionadas.

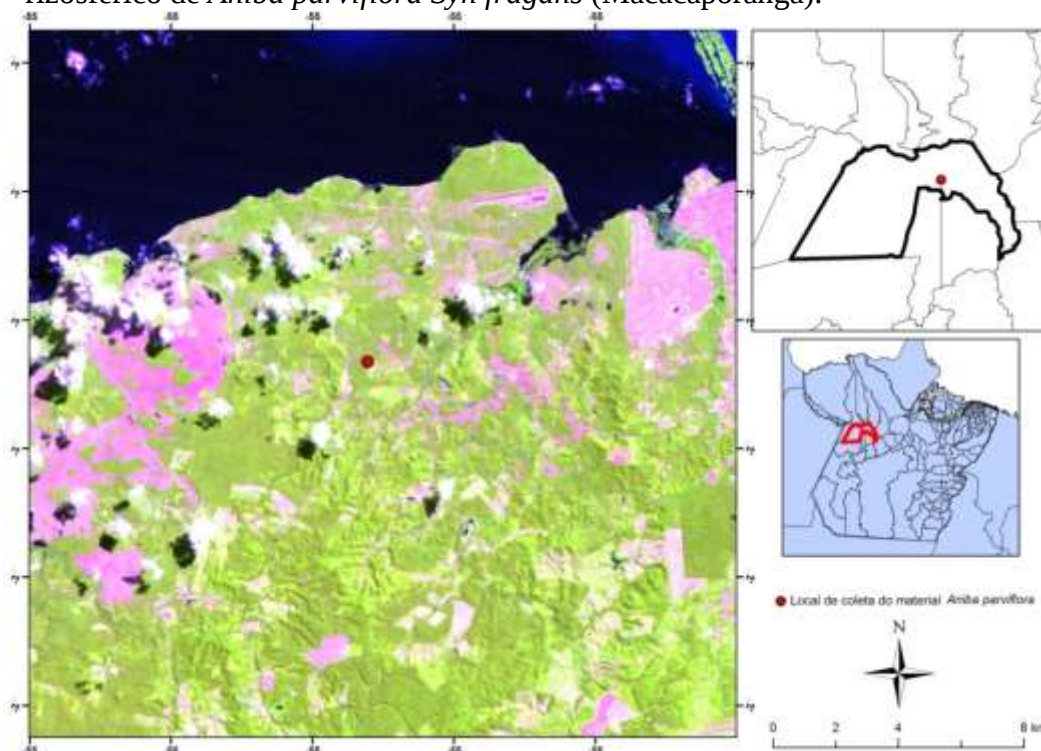
4. MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Local de coleta do material

Foi coletada uma amostra à partir de 40 g de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga) em uma área de transição entre Floresta Densa e uma área com características de cerrado (Latitude 2° 28' 01.28" de Longitude 54° 49' 45.32" O) no município de Santarém – PA, Brasil (Figura3).

Figura 3 - Mapa de coordenadas geográficas do ponto de coleta do solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga).



4.2 Isolamento

As linhagens de actinobactérias foram obtidas através de cultivo do solo em meio Arginina Levedura Agar – ALA (L-Arginina 0,3 g, Glicose 1 g, Glicerol 1 g, K₂HPO₄ 0,3 g, MgSO₄.7H₂O 0,2 g, NaCl 0,3 g, Extrato de Levedura 1 g, Solução de Sais 1 ml (FeSO₄. 7H₂O 0,1g, MnCl₂.4H₂O 0,1g, ZnSO₄.7H₂O 0,1g, Água Destilada 100 mL, pH= 7,0-7,4), Ágar 17 g, pH= 6,4, Água Destilada 1L) segundo NONOMURA e OHARA, 1969), à partir das diluições seriadas 10⁻¹ a 10⁻⁵ em tampão fosfato. Para inibir o crescimento de fungos filamentosos foi

adicionado no meio ALA o antifúngico Nistatina (100 µg/mL). Após semeadura de 100µL das diluições no meio, as placas foram acondicionadas em estufa por um período entre 14 e 21 dias a 37°C, sendo diariamente observada a característica das colônias para seleção das colônias de actinobactérias. Os aspectos morfológicos utilizados como parâmetro para classificar visualmente as colônias de actinobactérias foram colônias aderidas ao meio, observando a saliência do meio ao redor da colônia que se afunda no mesmo; colônias normalmente enrugadas, secas e não viscosas, micro hifas, excreção de pigmentos no meio e no micélio aéreo.

As colônias selecionadas foram transferidas para placas de Petri contendo o meio ISP-2 (Extrato de Levedura 4 g, Extrato de Malte 10 g, Glicose 4 g, Ágar 15 g e Água destilada 1 L, pH= 7,2) (PRIDHAM, HESSELTINE e BENEDICT, 1958) e posteriormente purificadas nos meios ISP-2 e ISP-3 (Farinha de Aveia 20g, Solução traços de sais 1mL, Ágar 15g e Água destilada 1L, pH 7,0 – 7,4), sendo incubadas por 7 dias à 37°C.

4.3 Identificação morfológica

4.3.1 Caracterização Macromorfológica – Cultivo

A caracterização dos aspectos culturais das linhagens foi determinada visualmente durante o cultivo nos meios de cultura ISP-1, ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5, ALA, BDA, SDA, AN, TSA à 30°C durante 20 dias (Bergey's, 2012). Foram avaliados a formação de micélio vegetativo e aéreo, a coloração das colônias, sua forma e produção de pigmentos. As composições dos meios utilizados encontram-se nos anexos A .

4.3.2 Caracterização micromorfológica - Microcultivo

Para análise microscópica, foram utilizadas as técnicas de microcultivo (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966) e coloração Gram. Para o microcultivo foi realizado uma semeadura em estria larga no centro da placa de Petri com o meio ISP-2, que posteriormente, foram inseridas lamínulas em posição vertical sobre a estria, formando um ângulo de aproximadamente 45°. As placas foram mantidas em estufa a 30°C por 14 dias, e posteriormente, a lamínula foi removida e disposta em lâmina de vidro (26 x 76 mm) para observação microscópica do micélio aéreo desenvolvido através de análise por microscopia óptica de luz comum em aumento de 400x (HOLT *et al.*, 1994).

4.4 Identificação Molecular

4.4.1 Extração de DNA bacteriano

O DNA bacteriano foi extraído conforme descrito por Stirling em 2003. Cerca de 5 ml de suspensão celular ($OD_{600} > 1.8$) foi centrifugada à 16.000 *g* por 4 min. Após a centrifugação foi acrescentado ao precipitado 400 μ L da Solução A (2% TrionX-100, 1% SDS, 0.1M NaCl, 0.01M Tris-HCL (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)), 200 mg de pérolas de vidro 0,1 mm (Sigma Z763721-50EA) e 100 μ l de Fenol:clorofórmio (Invitrogen - [15593-049](#)); e deixado sob agitação por 3 minutos.

Após a agitação foi acrescentado 400 μ l de tampão TE (1mM Tris-HCl (pH 8.0) e 1mM EDTA (pH 8.0)), suspensão homogeneizada e submetida à centrifugação por 5 minutos à 16000 *g*. Sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 1 ml de etanol absoluto. Centrifugado à 16.000 *g* por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 400 μ l tampão TE. Após adicionar 10 μ l de Acetato de Potássio (4M) e 1 ml de etanol absoluto seguida de centrifugação a 16.000 *g* por 5 minutos. O precipitado foi ressuspendido em água ultra-pura.

4.4.2 Condições da PCR

Para a reação de amplificação foi utilizada a enzima Platinum®.Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen 11304-011) seguida as recomendações do fabricante. As reações de amplificação foram feitas na Bioneer MyGenie 96 Thermal block (Global Genomics Partner) sob as seguintes condições: para o par de oligonucleotídeos Eub338F/Act1159R 95°C por 3'; 35 ciclos de 94 °C (30''), 68 °C (30''), 72 °C (90''); extensão de 72 °C (7') (FIERER *et al.*, 2005). E para o par fd1/rD1 95°C por 3'; 30 ciclos de 94 °C (1'), 55 °C (30''), 72 °C (2'); extensão de 72 °C (7').

4.4.3 Sequenciamento, análise e anotação das sequências

Produto da PCR foi purificado utilizando o kit GFX (GE Healthcare 28-9034-70) e subclonado no vetor pCR™2.1-TOPO® utilizando o kit TOPO TA Cloning (ThermoFisher Scientific [451641](#)). O plasmídio clonado foi propagado em *E. coli* DH5-alpha e purificado utilizando o kit (Fermentas K0503). Todos os procedimentos foram feitos seguindo as recomendações dos fabricantes. Para o sequenciamento foi utilizado os *primers* M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) e M13R (AACAGCTATGACCATG) para todos os

fragmentos subclonados no vetor pCRTM2.1-TOPO®. Para o completo sequenciamento do 16S rRNA foi utilizado os oligonucleotídeos (LANE, 1991) 341-357F (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704f (GTAGSGGTGAAATACGTAGA) e 1099-1114f (GCAACGAGCGCAACCC). O sequenciamento Sanger foi realizado ABI PRISM 3730 DNA ANALYZER, Applied Biosystems/Hitachi no Laboratório de Genômica e Elementos de Transposição (GaTE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (<http://gate.ib.usp.br/GateWeb-new/>). As sequências foram analisadas no programa CLC Main Workbench versão 7.0. Para anotação os *contigs* foram comparados contra o banco de dados BLAST acessado no dia 20 de Dezembro de 2015.

4.5 Características Bioquímica e Fisiológica

Após a confirmação do gênero *Streptomyces* sp. através da análise molecular as linhagens de *Streptomyces* sp. foram cultivadas em caldo ISP-2 (PRIDHAM, HESSELTINE e BENEDICT, 1958) à 30°C por 48 h sob agitação de 180 rpm à 30°C, e uma alíquota da cultura foi utilizada para preparação do esfregaço bacteriano em lâmina de vidro para identificação morfológica inicialmente através do método de Gram. As características fisiológicas e bioquímicas foram determinadas nos meios ISP – International *Streptomyces* Project (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966; WILLIAMS, SHARPE e HOLT, 1989; PETROVA e VLAHOV, 2013).

4.5.1 Produção de Proteases

A triagem das linhagens de *Streptomyces* produtoras das enzimas proteolíticas caseinase e gelatinase foi realizada em meio sólido contendo caseína e gelatina como substrato indutor. A degradação da caseína foi observada em placas contendo o meio contendo a base de Solução 1 (10g leite desnatado, 90mL Água destilada) e Solução 2 (3g Ágar, 97mL Água destilada). Após 14 dias de incubação, a formação de uma zona clara ao redor da colônia indicou a produção da enzima. A avaliação de produção de gelatinase foi realizada com o cultivo da bactéria em tubos de ensaio contendo o Meio agar nutriente acrescido de 12% de gelatina e mantida a 37°C por 7 dias. Posteriormente os tubos foram incubados sob refrigeração entre 4 e 10°C e o estado físico liquefeito do meio indicou a positividade do teste.

4.5.2 Produção de amilase

A linhagens de actinobactérias foram inoculadas na forma de bloco de gelose de 6 mm de diâmetro em triplicata no meio de cultura Agar-amido (5g Digestão péptica de tecido animal, 5g NaCl, 1,5g Extrato de carne bovina, 1,5g Levedura, 2g Amido solúvel, 15g Ágar, 1,5g Ácido glutâmico, 1000 mL Água destilada, pH 7,4), e incubadas em estufa por 10 dias a 28°C. Posteriormente foram adicionados 10mL da solução de lugol a 1% nas placas, e a descoloração do meio em torno da colônia resultante da hidrólise do amido indicou a produção da enzima (KUPIECKI e COON, 1957).

4.5.3 Produção de Catalase

As linhagens de actinobactérias foram cultivadas em meio de cultura NB (8g Caldo nutritivo, 15g Ágar, 1000 Água destilada)(MARIANO *et al.*, 2000) e incubadas em estufa por 10 dias a 28°C. Após esse período, amostras das colônias foram transferidas com auxílio de alça de platina para lâminas de microscopia estéreis e adicionado peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A formação de bolhas imediatamente após a adição do peróxido de hidrogênio indicou a positividade do teste.

4.5.4 Produção de Lipase

Para avaliar a produção de lipase e esterase, as linhagens de actinobactérias foram inoculadas na forma de bloco de gelose em triplicata, em meio contendo (10g Peptona, 5mL NaCl, 10mLTween 80 [10mLTween 80 e 40mL Água destilada], 15g Ágar, 1000mL Água destilada) (SIERRA, 1957). Para avaliação da esterase o meio foi base foi o mesmo citado anteriormente, modificando a fonte de carbono para Tween 20. Após incubação em estufa a 28°C por 10 dias. A observação de um halo branco difuso constituído de precipitados de oleato de cálcio indicou a presença da enzima.

4.5.5 Produção de Pectinase

A produção de pectinase foi avaliada em meio ágar TSA (1,5 g triptona, 0,5 g peptona de soja, 1,5 g NaCl, 1,5 g de ágar, pH 7,3) suplementado com 1% de pectina cítrica. As placas foram incubadas em estufa por 10 dias a 28°C. Posteriormente, foram adicionados

10mL da solução de lugol a 1% nas placas e a descoloração do meio em torno da colônia resultante da hidrólise da pectina cítrica indicou a produção da enzima.

4.5.6 Produção de L-glutaminase

A produção da enzima L-glutaminase foi avaliada segundo (BALAGURUNATHAN, RADHAKRISHNAN e SOMASUNDARAM, 2010a) após cultivo em ágar glutamina. As placas foram incubadas à 28°C por 7 dias e a produção da enzima foi indicada através da variação e intensidade na mudança de cor amarelo para rosa.

4.5.7 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi analisada após cultivo em meio Ágar Sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubadas à 30°C por 7 dias. A presença de um halo claro ao redor das colônias indicou a produção da enzima.

4.6 Avaliação de Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana das linhagens de *Streptomyces* sp. foi primeiramente realizada pelo método do bloco de gelose, (ICHIKAWA *et al.*, 1971), para determinar o potencial antagonístico frente a micro-organismos de interesse clínico e ambiental (Tabela 2). Após o cultivo das linhagens em meio ISP-2, à 30°C por 7 dias, foram removidos blocos de ágar circulares de 6 mm de diâmetro das placas contendo as colônias de actinobactérias e dispostos em placa de Petri (15mmx90mm) contendo Ágar Müller-Hinton (MHA) para bactérias e Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) para fungos, previamente semeadas com 100 µL da respectiva suspensão microbiana. As suspensões foram ajustadas a 0,5 da Escala de McFarland, correspondendo a 10^8 UFC/ml e 10^4 esporos/mL, de bactérias e de células de fungos, respectivamente.

Tabela 2. Relação dos micro-organismos teste utilizados no ensaio antimicrobiano.

Micro-organismo	Classificação
<i>Staphylococcus aureus</i> - 02	Bactéria Gram positiva
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> - 800	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 183	
<i>Micrococcus luteus</i> – 100	
<i>Bacillus subtilis</i> – 86	
<i>Enterococcus faecalis</i> - 138	Bactéria Gram negativa
<i>Salmonella enteritidis</i> – 415	
<i>Serratia marcescens</i> – 352	
<i>Serratia liquefaciens</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – 416	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> – 396	
<i>Serratia sp</i> – 398	
<i>Escherichia coli</i> – 224	
<i>Enterobacter aerogenes</i> - 348	
<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Proteus mirabilis</i> - 767	Fungo filamentoso
<i>Postia placenta</i>	
<i>Fusarium sp</i>	
<i>Polyporus sanguineus</i>	
<i>Rhizoctonia solani</i>	Levedura
<i>Candida albicans</i> - 1007	
<i>Candida krusei</i> - 1002	
<i>Candida sp</i>	

Coleção UFPEDA do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Para o controle negativo foram dispostos blocos de gelose contendo apenas o meio ISP-2. As placas foram incubadas à 37°C (bactérias e levedura) e à 30°C (Fungos filamentosos). O efeito antagonístico foi revelado com o aparecimento de halos de inibição de crescimento microbiano em volta dos blocos contendo a actinobacteria após 24h (bactérias), 48h (leveduras) e 96h (filamentosos).

A intensidade da atividade inibitória foi classificada de acordo com Sahin e Ugur (2003), sendo o tamanho do halo de inibição dividido em quatro grupos distintos: grupo inativo – halo de inibição menor e igual a 10mm; grupo ligeiramente ativo – halo de inibição entre 11 e 20mm; grupo moderadamente ativo – halo de inibição entre 21 e 30 mm; e grupo altamente ativo, cujo halo de inibição maior que 31mm.

Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.7 Obtenção de metabólitos secundários

4.7.1 Fermentação submersa

Para a produção dos metabólitos antimicrobianos foi realizado a fermentação submersa em meio M1 e MPE. Para o pré-inóculo foram utilizados erlenmeyers (250mL) contendo 50mL de meio de cultura ISP-2 líquido e adicionados três blocos de 6mm de diâmetro contendo a cultura das actinobactérias crescidas previamente no meio ISP-2 à 30°C por 14 dias. Os frascos foram mantidos em agitação de 180 rpm em incubadora rotatória (Modelo LUCA222) à 30°C por 48h. Posteriormente 10% do volume do pré-inóculo foi transferido para erlenmeyers (1000mL) contendo 250mL de meio de cultura M1 e MPE, o qual foi mantido nas mesmas condições sendo a fermentação realizada durante 168h.

Para avaliação da atividade antimicrobiana o líquido fermentado foi coletado à cada 24h e centrifugado a 927 *g*, durante 10 minutos para obtenção da biomassa e do sobrenadante do qual foi retirado uma alíquota de 1 mL, filtrado em membrana de acetato de celulose (0,22 µm de porosidade). A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em disco (BAUER *et al.*, 1966). Foi dispensado o volume de 30µL do líquido metabólico em discos de papel de filtro estéreis de 6 mm de diâmetro, os quais foram dispostos em placas de Petri (95mmx15mm) contendo os meios de cultura MHA e SDA, para o teste antibacteriano e antifúngico, previamente semeados com 100 µL da suspensão microbiana. A atividade antimicrobiana foi detectada pela presença de zonas de inibição em volta dos poços contendo o líquido metabólico, a qual foi expressa em milímetros. Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com 3 repetições sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A temperatura, o pH e a biomassa foram registrados durante todo o período de fermentação visando padronizar a melhor condição de fermentação para obtenção dos metabólitos antimicrobianos.

4.8 Extração do Antibiótico

O líquido fermentado foi filtrado à vácuo. O filtrado (líquido metabólico) foi dividido em volumes iguais e tratado em 3 condições para a extração de metabólitos: 1 – ajuste do líquido metabólico para pH 2; 2 – Manutenção do pH original do líquido metabólico; 3 - ajuste do líquido metabólico para pH 9.

A extração dos metabólitos secundários antimicrobianos foi realizada através de 3 extrações sucessivas utilizando os solventes orgânicos hexano, clorofórmio e acetato de etila na proporção de 2:1 do líquido metabólico. As fases orgânica de todas as extrações eram concentradas em evaporador rotativo à 40°C para a obtenção dos respectivos extratos brutos. A fase aquosa foi utilizada para o teste de atividade antimicrobiana por difusão em disco (BAUER *et al.*, 1966), nas mesmas condições citadas acima para o ensaio de atividade do líquido metabólico, visando verificar se após a etapa de extração ainda restavam metabólitos antimicrobianos.

4.9 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de hexano, clorofórmio e acetato de etila

4.9.1 Difusão em disco

Os extratos orgânicos foram diluídos a 10 mg/mL e posteriormente foi determinada a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco (BAUER *et al.*, 1966), para verificar em qual extrato estavam os metabólitos ativos. Como controle negativo discos foram embebidos com água destilada estéril.

4.9.2 Avaliação da Concentração mínima inibitória (CMI)

O extrato bruto da fermentação foi empregado para determinar a concentração inibitória mínima (CMI) pela técnica de microdiluição conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). Em uma microplaca estéril de 96 poços foram dispensadas diluições do extrato bruto.

Previamente, foi preparado uma solução à 10.000 µg / mL a partir dos extratos brutos solubilizado no respectivo meio de cultura líquido (MC) a 5% de DMSO. Nos poços 3 a 8 foram dispensados 100 µL do respectivo meio de cultura líquido e em seguida foi dispensado uma alíquota de 100 µL da solução mãe no poço 3, iniciando a microdiluição em série até o poço 11. Em cada poço foi adicionado 10µL do inóculo microbiano. Na coluna 1 foram dispensados 100 µL da solução de antibiótico padrão para cada micro-organismos teste, e em seguida foi adicionado 10µL do inóculo microbiano (Controle positivo – C+). Na coluna 2 foi dispensado apenas o meio de cultura, sendo este o teste de esterilidade do meio (Controle de esterilidade - C), e na coluna 12 foram dispensados 100 µL do respectivo meio de cultura líquido e em seguida foi adicionado 10µL do inóculo microbiano (Controle de viabilidade no inóculo – (Controle negativo (C-)). Após o período de cultivo à 37°C (bactérias) por 24h, e 30°C (leveduras) por 48h e 30°C (fungos filamentosos) por 96h, as microplacas foram

reveladas com 15 µL da solução de Resazurina a 0,01% e incubadas por 3 horas nas mesmas condições descritas anteriormente, para observação da coloração nos poços. A mudança de coloração dos poços inicialmente azul nos poços contendo as diferentes concentrações do extrato para vermelho indicou negatividade do teste, e a permanência da cor azul indicou a positividade. Nos poços de controle a permanência da cor azul indicou ação antimicrobiana e a mudança de coloração para vermelho indicou a viabilidade do inóculo.

A Concentração mínima fungicida ou bactericida foi determinada pela subcultura dos poços azuis da CMI em placa de Petri contendo o respectivo meio de cultura sólido. As placas foram incubadas à 37°C (bactérias) e 30°C por 48h (leveduras) ou 96h (fungos filamentosos), sendo que cada amostra foi testada em quatro experimentos independentes.

4.10 Prospecção química preliminar do extrato bruto mais ativo

O extrato bruto mais ativo foi diluído na concentração de 10 mg/mL do respectivo solvente e analisado pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas de sílica gel (TLC) (Merck), 60mm x 100mm, utilizando diversas fases móveis de diferentes polaridades para as classes de metabólitos (METZ, 1961; SHARMA e DAWRA, 1991; WAGNER e BLADT, 1996; HARBORNE, 1998).

4.11 Análise estatística

Foi utilizada a análise de variância – ANOVA para confirmação da normalidade dos dados obtidos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e foram analisados utilizando o test TUKEY ($p < 0,05$) no software Assistat 7.7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das linhagens de actinobactérias

Foram isolados 25 actinobactérias em meio ALA em 21 dias de cultivo. A placa de cultivo correspondendo a diluição 10^{-3} foi a que apresentou maior número unidades formadoras de colônias (UFC) de actinobactérias, correspondendo à 13 isolados, seguido da placa de diluição 10^{-4} com 9 isolados e a placa de diluição 10^{-5} com 3 isolados.

5.2 Aspectos macromorfológicos

No geral, as colônias microbianas das linhagens isoladas apresentavam aspecto compactado nos meios ISP2, ISP3, ISP4 e GAA, diferentemente das colônias observadas nos meios ALA, CAA e CZ, onde o micélio aéreo se desenvolve de forma pulverulenta no centro da colônia.

A linhagem MPO1 desenvolve micélio aéreo na maioria dos meios testados, exceto nos meios SDA, BDA e TSA. O micélio aéreo formado é abundante nos meios ISP1, ISP2 e ISP4, sendo este formado a partir do quarto dia de cultivo, a partir do quinto dia nos meios ISP3, ALA, CAA e GAA e a partir do sétimo dia de crescimento no meio CZ, ISP5 e AN.

O micélio aéreo da linhagem MPO1 foi predominantemente branco, e após quatorze dias de cultivo o micélio aéreo das colônias cultivadas em meio ISP2 e ALA tornam-se cinza. O micélio vegetativo foi observado a partir do segundo dia de crescimento nos meios ISP1, ISP2 e ISP4. A cor do micélio vegetativo variou entre tons de bege e amarelo (Tabela 3).

As colônias microbianas cultivadas nos meios ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ALA e GAA apresentam aspecto velutino, enquanto nos meios ISP5, CAA, CZ e AN apresentam característica pulverulenta (Figura 4). A linhagem MPO1 não produz pigmento em nenhum dos meios testados. Não foi observado crescimento nos meios Agar Sabouraud Dextrose (SDA), Agar Batata Dextrose (BDA), Agar Triptona de Soja (TSA).

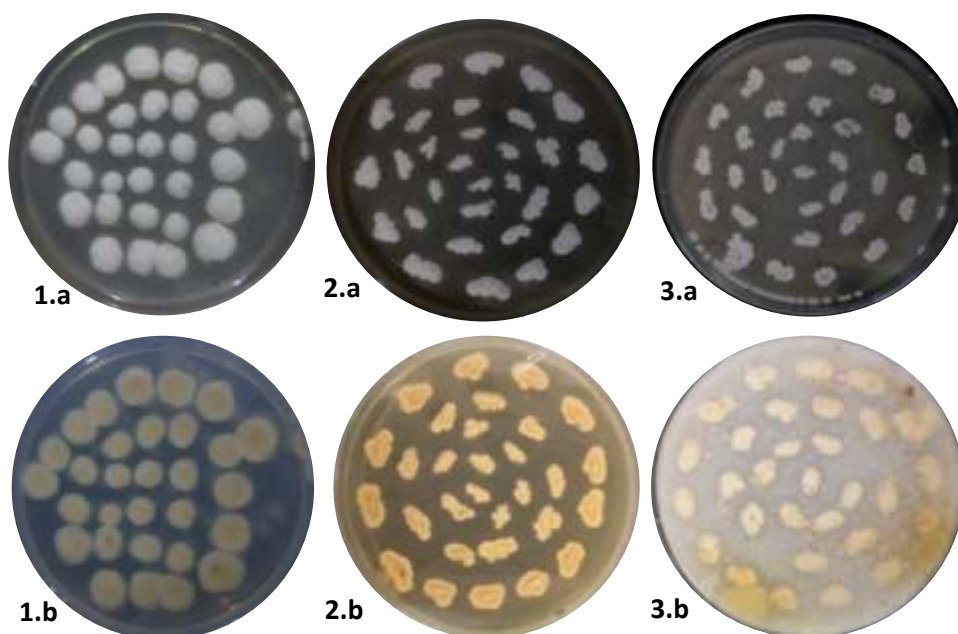
Tabela 3 - Aspectos Macroscópicos da linhagem MPO1 cultivada em diferentes meios de cultura.

Crescimento em diferentes meios de cultura.				
	Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo
ISP-1	+++	Branco	Bege	
ISP-2	+++	Branco	Amarelo	
ISP-3	++	Branco	Bege	
ISP-4	+++	Branco	Bege	
ISP-5	+	Branco	Bege	
ALA	++	Branco	Bege	
CAA	++	Branco	Bege	
GAA	++	Branco	Bege	
CZ	+	Branco	Bege	
SDA	-	-	-	
BDA	-	-	-	
AN	+	Branco	Bege	
TSA	-	-	-	

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

Para ilustrar as características observadas para a linhagem MPO1, a figura 4 mostra o crescimento em placas de Petri em diferentes meios de cultivo após 7 dias de cultivo à 37° C.

Figura 4 - Linhagem MPO1 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



A linhagem MPO2 cresce apenas nos meios ISP1, ISP2, ISP3 e ALA, sendo que no segundo dia de cultivo foi observada a presença de micélio aéreo no meio ISP2, e a partir do

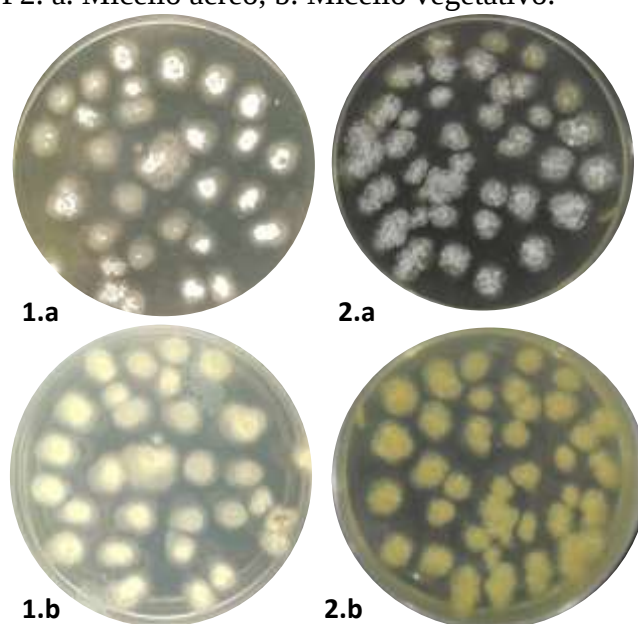
quinto dia nos demais meios de cultura (Tabela 4). As colônias formadas nos meios de cultura apresentam formas irregulares e aspecto pulverulento. O micélio aéreo formado é predominantemente branco, mantendo a coloração durante todo o período de crescimento (Figura 5).

Tabela 4 - Característica macroscópica da linhagem MPO2 em diferentes meios de cultura.

Meio	Esporulação	Micélio aéreo	Micélio vegetativo
ISP1	++	Branco	Bege
ISP2	++	Branco	Amarelo
ISP3	++	Branco	Amarelo
ISP4	-	-	-
ISP5	-	-	-
ALA	++	Branco	Amarelo

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

Figura 5 - Linhagem MPO2 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



A linhagem MPO3 desenvolveu micélio aéreo na maioria dos meios de cultura testados, sendo que foi possível observar já no terceiro dia de cultivo a presença de micélio aéreo nos meios ISP2, ISP3, ALA e SDA, exceto os meios ISP5, CAA, GAA e CZ (Tabela 5). O micélio vegetativo foi observado a partir do primeiro dia de crescimento nos meios TSA, ISP1, ISP2, ALA e AN. A cor do micélio vegetativo variou entre tons de bege e amarelo escuro.

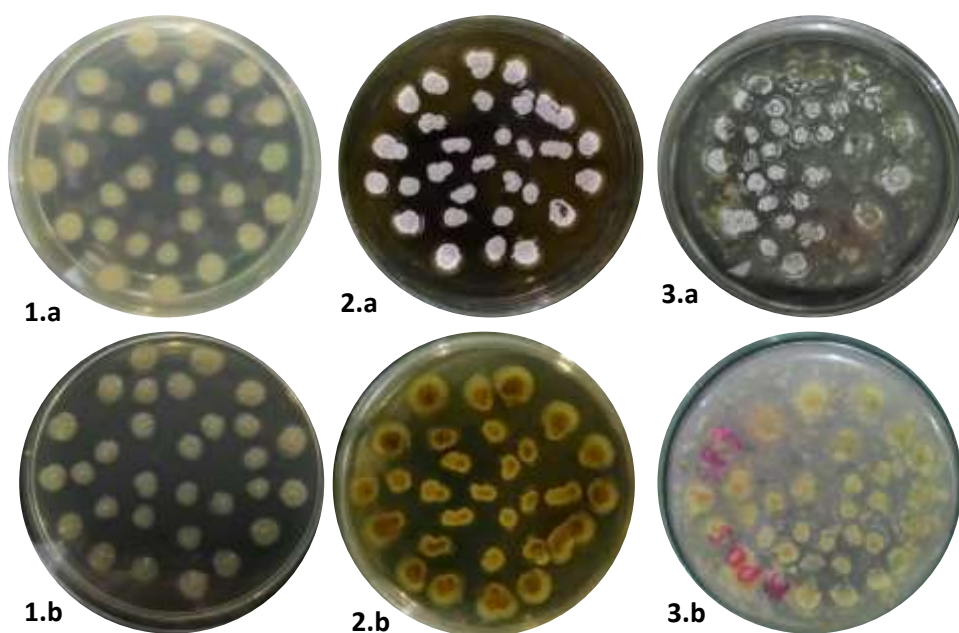
O micélio aéreo formado era predominantemente branco, e após 7 e 14 dias de crescimento, tornou-se cinza nos meios ISP3 e SDA, respectivamente. Já no meio ISP2 para o mesmo período de crescimento o micélio aéreo mantém a cor branca. As colônias microbianas formadas nos meios ISP1, ISP3, ISP4, ALA, SDA, AN e TSA são pulverulentas e nos meios ISP2 e BDA são velutinas (Figura 6). Não foi observado crescimento nos meios CAA, GAA e CZ. A linhagem MPO3 não produziu pigmento em nenhum dos meios testados.

Tabela 5 – Características macroscópicas da linhagem MPO3 cultivada em diferentes meios de cultura.

Meio	Esporulação	Micélio aéreo	Micélio vegetativo
ISP1	+	Branco	Bege
ISP2	++	Branco/ Cinza	Amarelo escuro
ISP3	++	Branco	Amarelo
ISP4	+	Branco	Amarelo
ALA	+	Branco	Bege
SDA	+++	Branco/ Cinza	Amarelo claro
BDA	+	Branco	Amarelo claro
AN	+	Branco	Bege
TSA	+	Branco	Bege

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

Figura 6 - Linhagem MPO3 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



A linhagem MPO4 desenvolve micélio aéreo apenas nos meios ISP1, ISP2, ALA e AN. O micélio aéreo formado é abundante nos meios ISP1, ISP2 e AN, sendo este formado a partir do quinto dia de cultivo no meio ALA.

O micélio aéreo formado foi predominantemente branco. O micélio vegetativo foi observado a partir do terceiro dia de crescimento nos meios ISP1, ISP2 e AN. A cor do micélio vegetativo variou entre tons de bege e amarelo (Tabela 6).

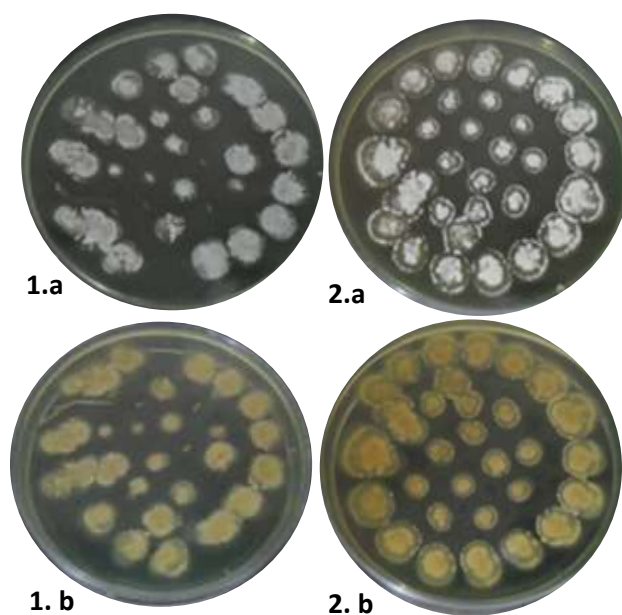
As colônias microbianas formadas nos meios ISP1 e AN apresentaram aspecto velutino, já as colônias formadas nos meios ISP2 e ALA apresentam característica pulverulenta (Figura 7). A linhagem MPO4 não produz pigmento em nenhum dos meios testados.

Tabela 6 - Características macroscópicas da linhagem MPO4 cultivada em diferentes meios de cultura.

Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo
ISP1	+++	Branco	Amarelo claro
ISP2	+++	Branco	Amarelo
ALA	++	Branco	Bege
AN	+++	Branco	Amarelo claro

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

Figura 7 - Linhagem MPO4 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



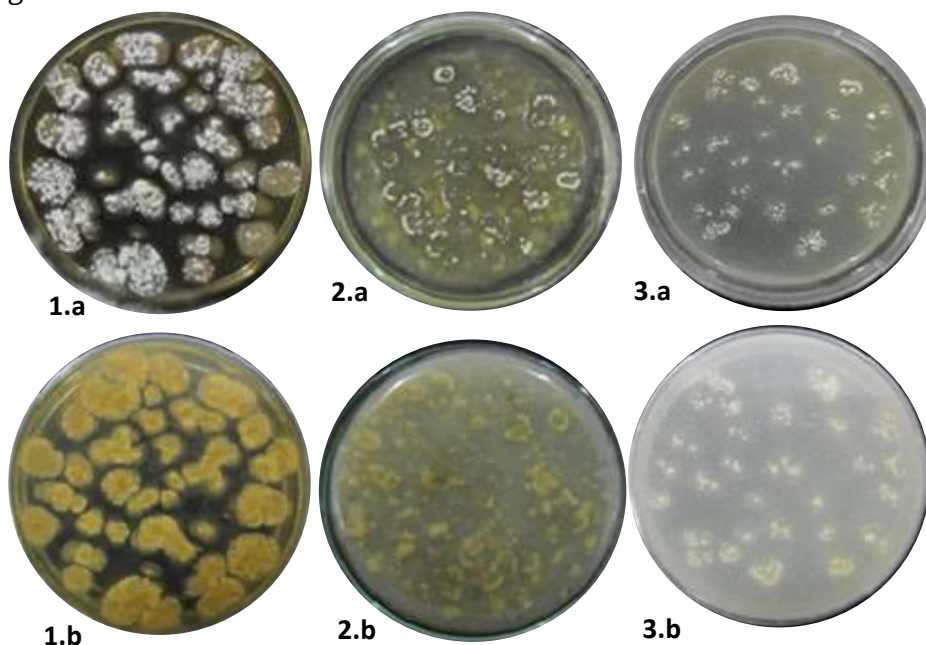
A linhagem MPO5 desenvolve micélio aéreo nos meios ISP2, ISP3, ISP4, ALA e AN, com formação abundante do micélio aéreo no meio ISP2 (Tabela 7). O micélio vegetativo foi observado a partir do terceiro dia de crescimento nos meios ISP2, ISP3 e a partir do quarto dia nos meios ISP4, ALA e AN. A cor do micélio vegetativo variou entre tons de bege e amarelo escuro (Figura 8). Não foi observado crescimento nos meios CAA, GAA, CZ, SDA, BDA e TSA.

Tabela 7 - Características macroscópicas da linhagem MPO5 cultivada em diferentes meios de cultura.

Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo
ISP2	+++	Branco	Amarelo escuro
ISP3	++	Branco	Amarelo
ISP4	++	Branco	Bege
ALA	+	Branco	Amarelo
AN	+	Branco	Amarelo

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

Figura 8 - Linhagem MPO5 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP2; 2. ISP3; 3. ISP4. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



A linhagem MPO6 desenvolve colônias ásperas convexas, circulares com borda irregular (Figura 9). O micélio aéreo é formado nos meios ISP1, ISP2, ISP5, ALA, CAA, CZ,

NA e TSA, observado a partir do terceiro dia de cultivo nos meios ISP1, ISP2, ISP5 e ALA. Não há crescimento microbiano nos meios ISP3, ISP4, GAA, SDA e BDA.

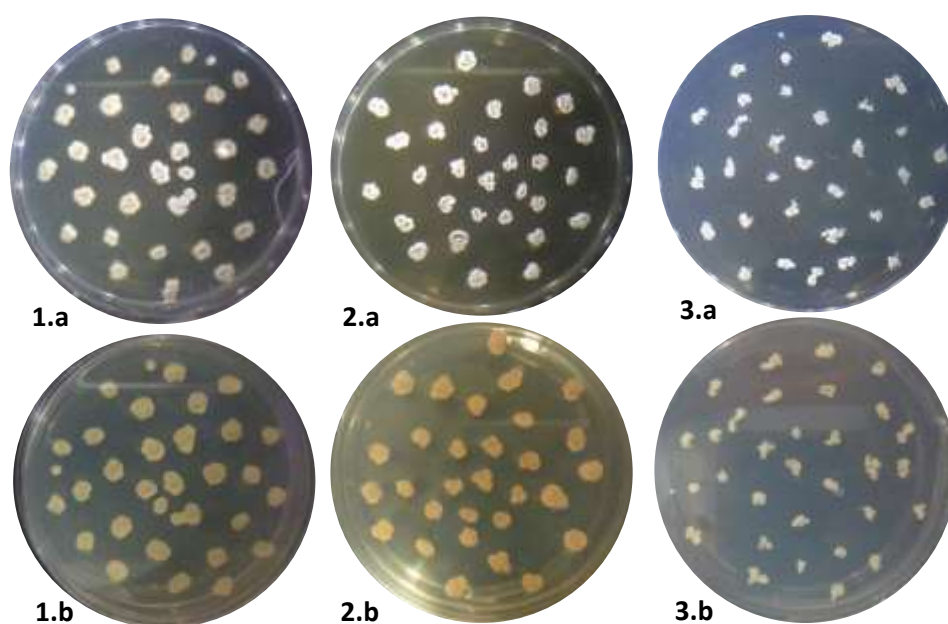
A coloração do micélio aéreo é predominantemente branco tornando-se rosa claro após sete dias de cultivo no meio ISP2 (Tabela 8). A linhagem MPO6 produz pigmento solúvel no meio ISP2 após cinco dias de cultivo, modificando o meio para cor âmbar e no meio ALA há produção de pigmento na cor verde escuro. As colônias microbianas da linhagem MPO6 apresentam aspecto pulverulento nos meios ISP5, CAA, CZ, AN e TSA, e aspecto velutino nos meios ISP1, ISP2 e ALA.

Tabela 8 - Características macroscópicas da linhagem MPO6 cultivada em diferentes meios de cultura.

Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo	Pigmento difuso
ISP1	++	Branco	Amarelo	-
ISP2	++	Branco	Amarelo escuro	Âmbar
ISP5	+	Branco	Amarelo	-
ALA	++	Branco	Cinza escuro	Verde
CAA	+	Branco	Bege	-
CZ	+	Branco	Bege	-
AN	+	Branco	Amarelo	-
TSA	+	Branco	Bege	-

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

Figura 9 - Linhagem MPO6 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1. ISP1; 2. ISP2; 3. ISP5. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



A linhagem MPO7 desenvolveu micélio aéreo nos meios ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ALA, CAA e GAA, a partir do quarto dia de cultivo. Não houve crescimento nos meios ISP5, CZ, BDA e SDA.

O micélio vegetativo é formado a partir de 24h de cultivo, sendo que o diâmetro do micélio vegetativo nos meios ISP4 e CAA é pouco desenvolvido. A cor do micélio vegetativo varia da cor bege nos meios ISP1, ISP3, ISP4, ALA, CAA e TSA, a amarelo nos meios ISP2, GAA e NA (Tabela 9).

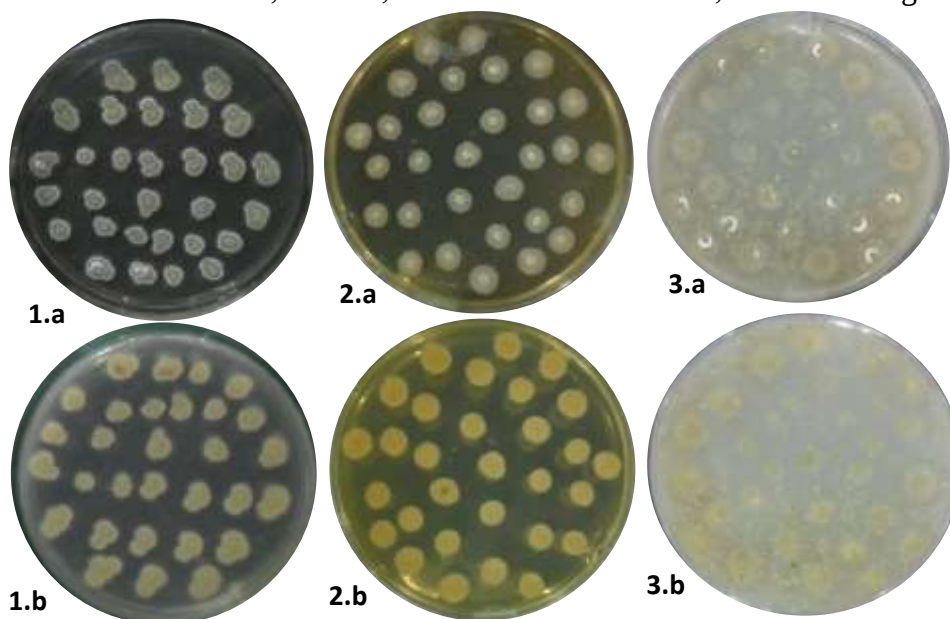
A coloração do micélio aéreo é predominantemente branco, tornando-se cinza claro após vinte e um dias de cultivo no meio ISP2. A linhagem MPO7 produz pigmento solúvel no meio ISP2 após vinte e um dias de cultivo, mudando a coloração do meio para cor âmbar. As colônias microbianas da linhagem MPO7 apresentam aspecto pulverulento nos meios ISP3, ISP4, ALA, CAA e TSA, e aspecto velutino nos meios ISP1, ISP2, GAA e AN (Figura 10).

Tabela 9 - Características macroscópicas da linhagem MPO7 cultivada em diferentes meios de cultura.

Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo
ISP1	+++	Branco	Bege
ISP2	+	Branco	Amarelo
ISP3	+	Branco	Bege
ISP4	+	Branco	Bege
ALA	++	Branco	Bege
CAA	+	Branco	Bege
GAA	++	Branco	Amarelo claro
NA	+++	Branco	Amarelo
TSA	++	Branco	Bege

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

Figura 10 - Linhagem MPO7 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



A linhagem MPO8 desenvolve micélio aéreo na maioria dos meios de cultura testados, com desenvolvimento do micélio aéreo a partir do quarto dia de cultivo nos meios ISP2, ISP3, ISP5, ALA, CAA, GAA, DAS e NA. Não foi observado crescimento nos meios ISP1, ISP4, CZ, BDA e TSA. O micélio aéreo é abundante no meio ISP2, sendo este formado logo após três dias de cultivo. A cor do micélio aéreo é predominantemente branco tornando-se cinza claro após sete dias de cultivo no meio ISP2 e após vinte e um dias no meio SDA (Tabela 10).

Tabela 10 - Características macroscópicas da linhagem MPO8 cultivada em diferentes meios de cultura.

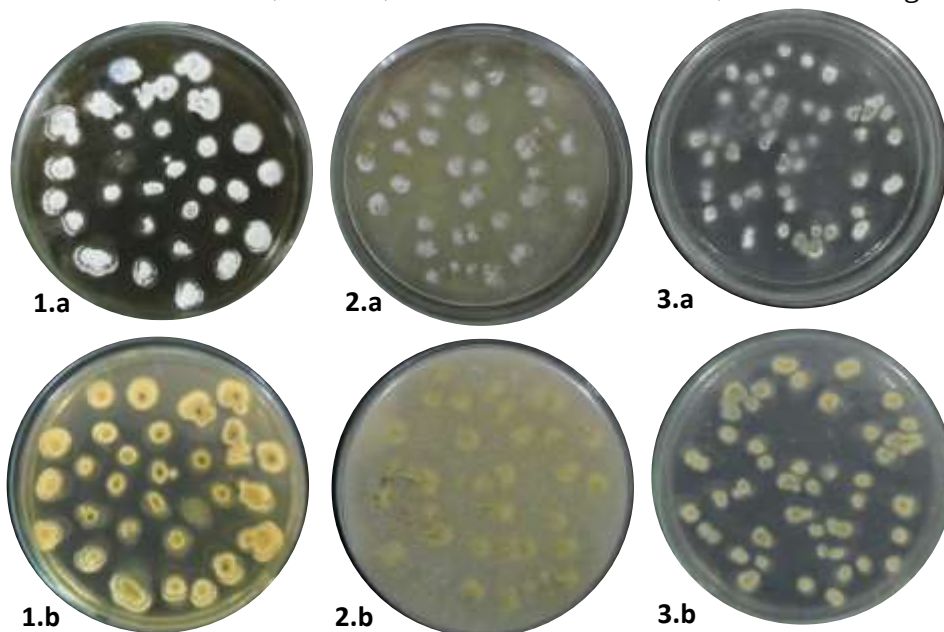
Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo	Pigmento difuso
ISP2	+++	Branco	Amarelo escuro	Marrom
ISP3	++	Branco	Amarelo	-
ISP5	++	Branco	Amarelo	-
ALA	++	Branco	Amarelo escuro	-
CAA	+	Branco	Bege	-
GAA	++	Branco	Amarelo claro	-

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

O micélio vegetativo é formado a partir do primeiro dia de crescimento no meio ISP2, no segundo dia nos meios ALA, CAA, SDA e NA, e após o terceiro dia nos meios ISP5

e GAA. A cor do micélio vegetativo varia entre tons de bege e amarelo escuro. A linhagem MPO8 produz pigmento em meio ISP2 após sete dias de cultivo modificando o meio inicialmente amarelo claro para marrom. As colônias microbianas formadas nos meios ISP3, ISP5, ALA, CAA e GAA são pulverulentas, e apenas as colônias formadas em ISP2 são velutinas. Não houve crescimento nos meios ISP1, ISP4, CZ, SDA, BDA, AN, TSA (Figura 11).

Figura 11 - Linhagem MPO8 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1. ISP2; 2. ISP3; 3. ISP5. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



A linhagem MPO9 desenvolve micélio aéreo na maioria dos meios de cultura, sendo que o micélio aéreo é formado a partir do terceiro dia de cultivo nos meios ISP3, ALA e ISP2. Não há crescimento microbiano nos meios CZ, SDA, BDA, AN e TSA (Tabela 11).

Tabela 11 - Características macroscópicas da linhagem MPO9 cultivada em diferentes meios de cultura.

Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo
ISP1	++	Cinza	Amarelo
ISP2	++	Branco/ Cinza	Amarelo escuro
ISP3	+++	Branco/Grafite	Verde escuro
ISP4	++	Branco	Bege
ISP5	+	Branco	Bege
ALA	+++	Branca/Cinza	Amarelo
CAA	++	Branco	Bege
GAA	++	Branco	Amarelo claro

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

O micélio vegetativo é formado a partir do segundo dia de cultivo nos meios ISP3, ALA e ISP2, e após o terceiro dia nos demais meios de cultura. A cor do micélio vegetativo varia entre tons de bege nos meios ISP4, ISP5 e CAA a amarelo nos meios ISP1, ISP2, ALA e GAA e verde, como observado no meio ISP3 (Figura 12). Não houve crescimento nos meios CZ, SDA, BDA, AN e TSA.

A linhagem MPO10 apresenta micélio aéreo de coloração que varia entre a cor branco e cinza, sendo que nos meios ISP4, ISP5, CAA e GAA não há mudança de coloração durante o cultivo (Tabela 12). Há mudança na coloração do micélio aéreo inicialmente branco para tons de cinza após o quinto dia de cultivo nos meios ISP2 (cinza), ALA (cinza) e ISP3 (grafite). Apenas no meio ISP1 o micélio aéreo é cinza. A linhagem MPO10 não produz pigmento nos meios de cultura utilizados. As colônias microbianas da linhagem MPO9 apresentam aspecto pulverulento nos meios ISP5, ALA, CAA e GAA, e aspecto velutino nos meios ISP1, ISP2, ISP3 e ISP4 (Figura 13).

Figura 12 - Linhagem MPO9 nos diferentes meios de cultura após 7 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.

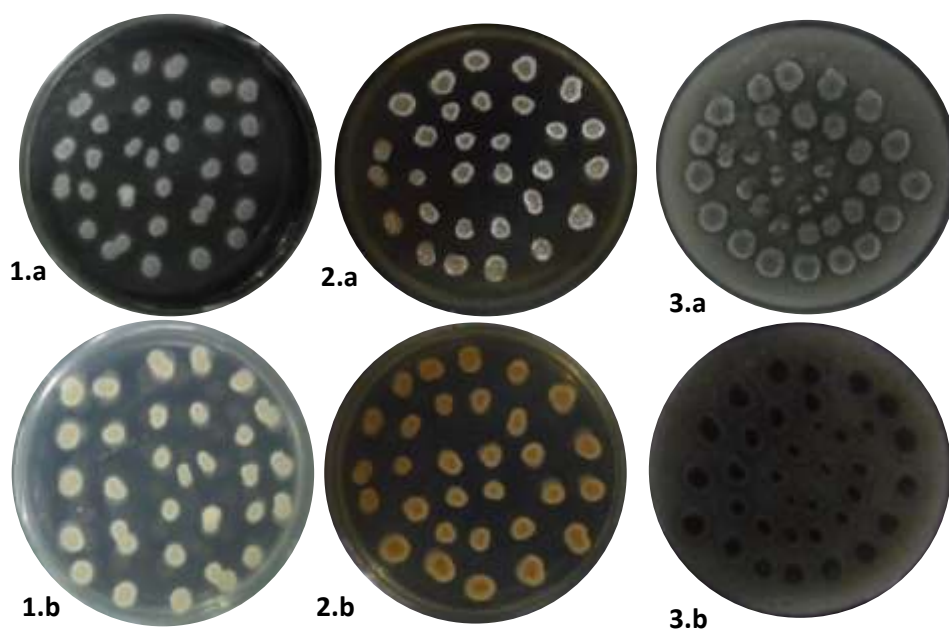
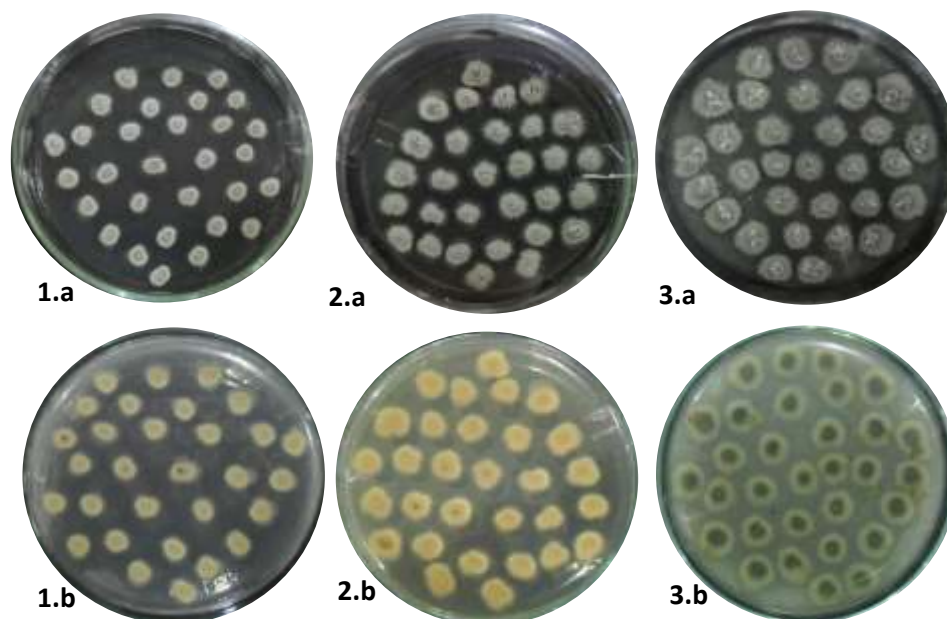


Tabela 12 - Características macroscópicas da linhagem MPO10 cultivada em diferentes meios de cultura.

Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo
ISP1	++	Cinza claro	Amarelo
ISP2	+++	Cinza escuro	Amarelo
ISP3	+++	Cinza escuro	Verde escuro
ISP4	++	Cinza claro	Amarelo / Verde escuro
ISP5	+	Branco	Amarelo / Verde escuro
ALA	+	Cinza	Branco

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

Figura 13 - Linhagem MPO10 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



A linhagem MPO11 desenvolve micélio aéreo na maioria dos meios de cultura testados (Tabela 13). O micélio vegetativo é formado a partir do primeiro dia de cultivo nos meios ISP1, ISP2 e ISP3, e após o terceiro dia nos demais meios de cultura. A cor do micélio vegetativo varia entre o bege nos meios ISP1, ALA e CAA, amarelo nos meios ISP2 e GAA, e verde escuro no ISP3 e ISP4 (Figura 14).

Tabela 13 - Características macroscópicas da linhagem MPO11 cultivada em diferentes meios de cultura.

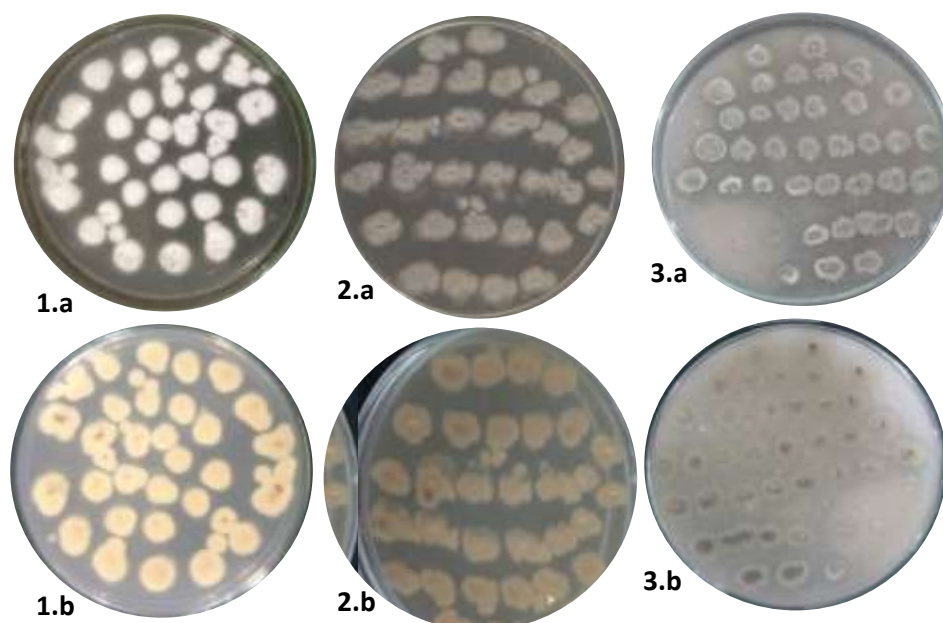
Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo	Pigmento difuso
ISP1	+++	Branco	Amarelo	-
ISP2	+++	Cinza	Amarelo	-
ISP3	+++	Cinza claro	Verde escuro	-
ISP4	++	Cinza claro	Verde escuro	Vermelho
ALA	++	Cinza	Bege	-
CAA	+	Branco	Bege	-
GAA	++	Cinza	Amarelo	-

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

O micélio aéreo é formado a partir do segundo dia de cultivo nos meios ISP1, ISP2 e ISP3, e a partir do quarto dia nos demais meios de cultura. Não há crescimento microbiano nos meios CZ, SDA, BDA, AN e TSA. A coloração do micélio aéreo varia entre a cor branco e tons de cinza, sendo que no meio ISP2, ALA e GAA há mudança de coloração do micélio

aéreo inicialmente branco e torna-se cinza após o sétimo dia de cultivo. As colônias crescidas nos meios de cultura ISP1 e CAA mantêm a coloração branca do micélio aéreo durante todo o período de cultivo. Há produção de pigmento difuso vermelho no meio ISP4 após o sétimo dia de cultivo. As colônias apresenta aspecto pulverulento no meio ISP2 e velutino nos demais meios. Não houve crescimento nos meios ISP5, CZ, SDA, BDA, AN e TSA.

Figura 14 - Linhagem MPO11 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



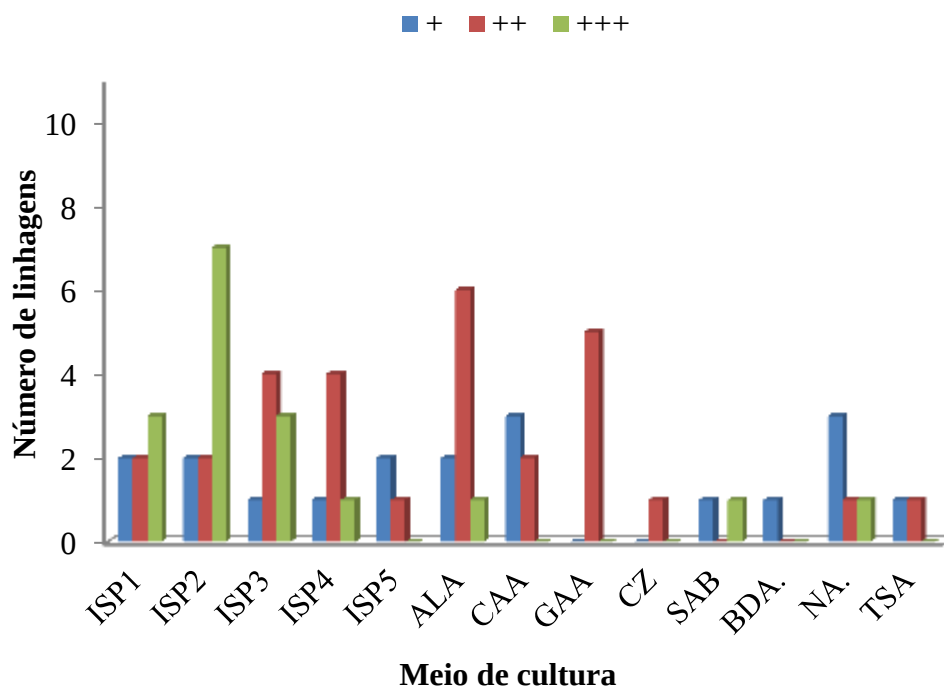
A maioria dos isolados desenvolveu micélio aéreo aproximadamente após cinco dias de cultivo no meio ISP2. Este aspecto é peculiar ao grupo das actinobactérias, sendo que as colônias têm crescimento lento, necessitando em torno de 7 a 10 dias para desenvolver o micélio aéreo (SRINIVASAN, LAXMAN e DESHPANDE, 1991; HOPWOOD, 1999; FLARDH e BUTTNER, 2009).

A maioria das linhagens de actinobactérias isoladas apresenta bom crescimento nos meios acrescidos de sais minerais ISP3 e ISP4, exceto as linhagens MPO2, MPO4, MPO6 que não crescem em nenhum dos dois meios, e a linhagem MPO8 que cresce apenas no meio ISP3 (Figura 15).

Estes dados estão de acordo com as características da maioria dos membros do grupo das Actinobactérias, que cresce preferencialmente em meios acrescidos de sais minerais,

aminoácidos, amido e caseína (WILLIAMS, SHARPE e HOLT, 1989; GOODFELLOW e FIEDLER, 2010).

Figura 15 - Crescimento das linhagens de actinobactérias MPO isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga).



Apenas a linhagem MPO1 cresce em meio CZ. O meio BDA também é um meio com pouco crescimento para as linhagens de actinobactérias isoladas, sendo registrado crescimento apenas para a linhagem MPO3. O pH também é um fator determinante para o crescimento das colônias de actinobactérias, uma vez que para a maioria dos micro-organismos deste grupo o pH é próximo à neutralidade, raras as exceções que esporulam apenas em pH entre 4,5 a 5,0.

A temperatura utilizada para o cultivo das placas de isolamento de actinobactérias, assim como as placas para obtenção das culturas puras e avaliação do crescimento de colônias bacterianas nos diferentes meios de cultura utilizados foi de 37°C, a qual representa uma das temperaturas ótimas de crescimento segundo Holt (1984) e Goodfellow e Fiedler (2010), que indicam a faixa de temperatura de incubação de actinobactérias entre 25°C e 37°C (HOLT *et al.*, 1994; GOODFELLOW e FIEDLER, 2010).

As linhagens MPO1 a MPO8 apresentaram colônias pequenas pulverulentas e velutinas nos meios onde desenvolvem micélio aéreo. A coloração do micélio aéreo

apresentou variação na cor branca como observado nas linhagens MPO1 à MPO11, e diferentes tons de cinza nas linhagens MPO9, MPO10 e MPO11.

Apenas a linhagem MPO6 apresentou colônias circulares convexas de aspecto rugoso, com desenvolvimento abundante do micélio vegetativo e micélio aéreo bem aderido ao meio (Figura 16).

Figura 16 - Actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga) cultivadas em meio ISP2 após 14 dias à 37°C. Microscópio estereoscópio, aumento de 40 x. 1.a. MPO1; b. MPO3; c. MPO4; d. MPO5; e. MPO6; f. MPO7; g. MPO8; h. MPO9; i. MPO10; j. MPO11. Aumento 40x.



A produção de pigmentos solúveis de cores variadas foi observada nas linhagens MPO6 quando cultivado em meio ISP2 e ALA, MPO10 e MPO11 quando cultivada em ISP4, indicando que nestas condições a via de biossíntese do metabólito está ativa. Esta é uma característica distinta das colônias de *Streptomyces*, diferindo do observado no metabolismo de outros membros do grupo, como ocorre nos gêneros *Frankia*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Thermoactinomyces* (SOARES et al., 2010).

5.3 Caracterização micromorfológica

Na figura 17 é apresentado o registro fotográfico das placas de microcultivo das linhagens de actinobactérias isoladas após 14 dias de crescimento à 37° C, indicando que todas desenvolveram micélio aéreo.

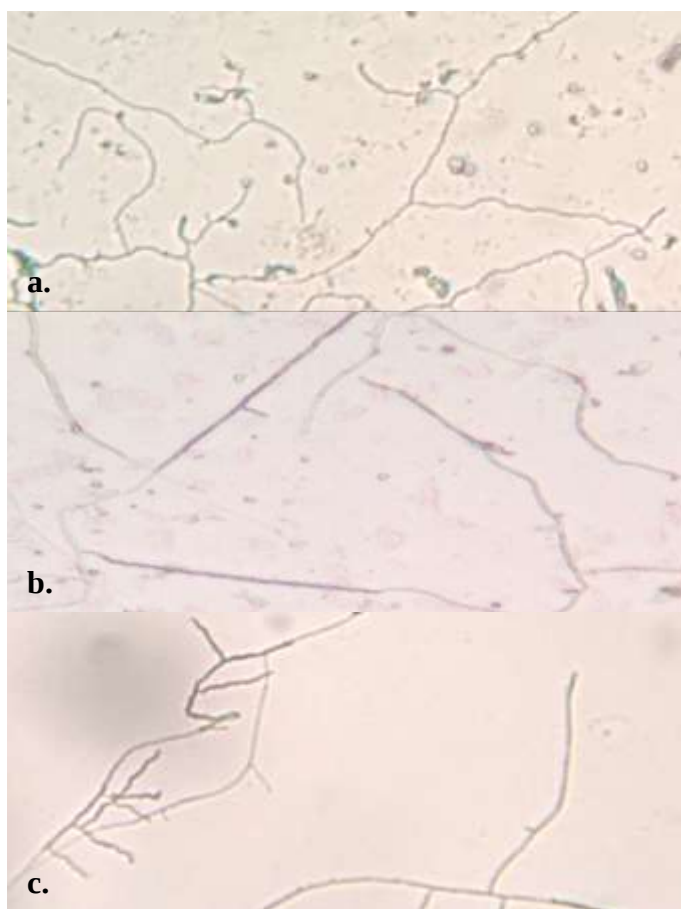
Figura 17 - Microcultivo das linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga), após 14 dias de crescimento à 37° C. a. MPO1, b. MPO2, c. MPO3.



A partir da análise microscópica por microscopia óptica de luz comum em micromorfologia acompanhada durante 21 dias, foi observado que as linhagens de actinobactérias isoladas apresentaram diversos tipos de cadeias de esporos.

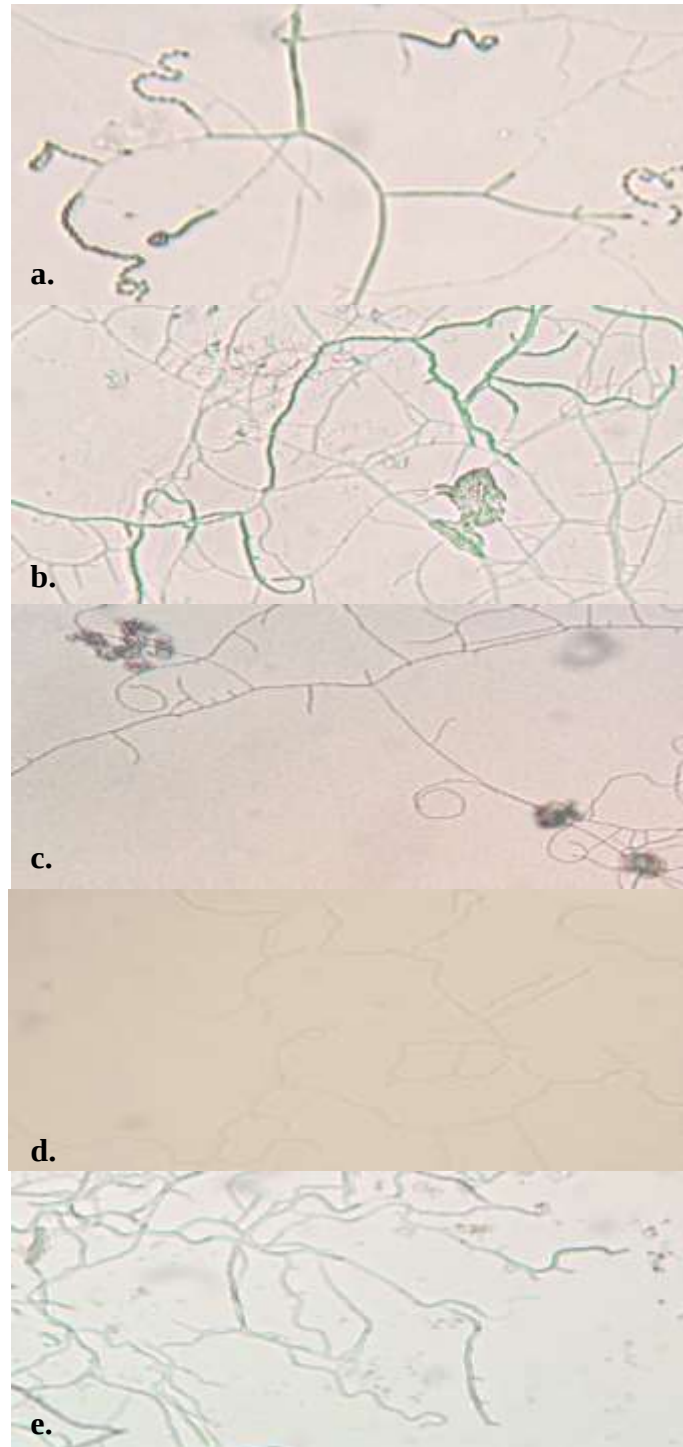
As linhagens MPO2, MPO4 e MPO8 apresentaram cadeia de esporos simples flexíveis, sugestivo do gênero *Streptomyces* sp. (Figura 18).

Figura 18 - Cadeia de esporos simples flexível das linhagens. a MPO2; b. MPO4; c. MPO8.



As linhagens MPO1, MPO3, MPO5 e MPO7 apresentam cadeia de esporos simples *Retinaculum apertum* com esporóforo semelhante a um gancho, sugestivos para o gênero *Streptomyces* sp. (Figura 19).

Figura 19 - Microscopia de Luz mostrando a cadeia de esporos. a. MPO1; b. MPO3; c. MPO5; d. MPO7; e. MPO11.



As linhagens MPO6, MPO9 e MPO11 apresenta cadeias de esporos simples espiraladas (Figura 20).

Figura 20 - Microscopia de Luz mostrando aspectos microscópicos de *Microbacterium* a. MPO6. *Streptomyces*. b. MPO9, c. MPO10.



As linhagens de actinobactérias MPO1 à MPO11 apresentam morfologia diversificada, sendo que a forma e organização dos esporos são aspectos importantes para a identificação taxonômica dos diversos gêneros que este grupo abrange.

A cadeia de esporos do gênero *Streptomyces* pode apresentar, micromorfologia em diferentes formas. Nas linhagens MPO1, MPO2, MPO3, MPO4, MPO5, MPO7, MPO9, MPO10, MPO11 foram observadas características microscópicas compatíveis com o gênero *Streptomyces* sp, como hifas do tipo espiral, espiral aberto e flexuosa e a coloração dos esporos variou entre branca, creme, cinza e de branca a cinza, como observado em linhagens já descritas na literatura.

5.4 Análise molecular

A análise das sequências moleculares obtidas permitiu confirmar que as 11 linhagens de actinobactérias pertencem ao gênero *Streptomyces* sp. (Tabela 14).

Tabela 14 – Dados de identificação molecular das linhagens de actinobactérias.

Linhagem	Conteúdo de G+C	Tamanho (bp)	Oligonucleotídeo forward	Oligonucleotídeo reverse	Similaridade %	Correspondência	Genebank ID
MP01	57.75%	781	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1
MP02	58.28%	767	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1
MP03	58.57%	828	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1
MP04	58.52%	827	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1
MP05	58.45%	763	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1
MP06	58.45%	763	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1
MP07	58.52%	827	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1
MP08	58.26%	769	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1
MP09	58.52%	827	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1
MP010	57.75%	781	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1
MP011	58.45%	763	Eub338F** - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGTTRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR06321 5.1

* (Weisburg *et al.*, 1991). ** (Fierer *et al.*, 2005). *** (Blackwood, Oaks e Buyer, 2005).

5.5 Utilização de fontes de Carbono e Nitrogênio

A glicose é preferencialmente utilizada pelas actinobactérias isoladas como fonte de Carbono (Tabela 15). *Streptomyces* sp. MPO1 utilizou apenas 3 fontes de carbono, tendo formação do micélio aéreo nos meios contendo frutose, glicose e sorbitol.

Streptomyces sp. MPO2 utiliza 9 das 14 fontes de carbono testadas, exceto Arabnose, Melezitose, Sorbitol, Trealose e Xilose (Figura 21). *Streptomyces* sp. MPO3 desenvolve micélio aéreo apenas no substrato com manitol, rhamnose e glicose. *Streptomyces* sp. MPO4 desenvolve micélio aéreo abundante no meio contendo sacarose, moderado em sorbitol, trealose, inositol, lactose, e pouco em glicose, arabnose e xilose. *Streptomyces* sp. MPO5 utiliza poucas fontes de carbono, sendo observado pouco desenvolvimento de micélio aéreo em substrato com celulose e rhamnose.

Microbacterium xylanilyticum MPO6 utiliza 12 das 14 fontes de carbono testadas, com desenvolvimento moderado do micélio aéreo, exceto L-arabinose e D-xilose. *Streptomyces* sp. MPO7 em 11 fontes de carbono, apresentou moderada formação do micélio aéreo no substrato com glicose.

Streptomyces sp. MPO8 não utiliza apenas a xilose como fonte de carbono para seu crescimento, sendo observado desenvolvimento moderado de micélio aéreo em manose e glicose. A linhagem MPO9 utiliza a maior parte das fontes de carbono testadas, formando micélio aéreo abundante nos substratos com inositol, lactose, manitol, sacarose, trealose.

A linhagem MPO9 utiliza a maior parte das fontes de carbono testadas, formando micélio aéreo abundante nos substratos com Inositol, Lactose, Manitol, Sacarose, Trealose. A linhagem MPO10 utiliza todas as fontes de carbono testadas, com desenvolvimento moderado do micélio aéreo. A linhagem MPO11 utiliza a 11 fontes de carbono testadas, desenvolvendo micélio aéreo abundante no substrato com arabnose, manose, lactose, melezitose, sacarose e sorbitol.

As linhagens MPO2, MPO7, MPO8, MPO9 e MPO10 utilizaram todas as fontes de nitrogênio testadas, sendo que o substrato com Histidina e Metionina foi o substrato menos utilizado (Tabela 16) (Figura 22)

Tabela 15 – Utilização de fontes de Carbono pelas linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (macacaporanga).

Fonte	MPO1	MPO2	MPO3	MPO4	MPO5	MPO6	MPO7	MPO8	MPO9	MPO10	MPO11
L-Arabinose	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Celulose	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
D-Manose	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
D-Lactose	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
D-Manitol	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
D-Melezitose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D-Rhamnose	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Sacarose	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
Trealose	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
D-Xilose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+

+ positividade para o consumo da fonte; - negatividade para o consumo da fonte.

Tabela 16 – Utilização de fontes de nitrogênio pelas linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (macacaporanga).

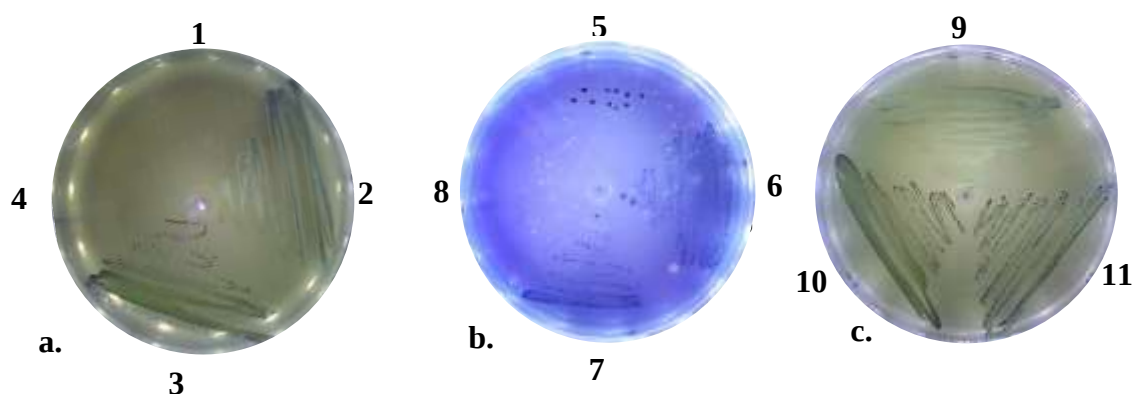
Fonte	MPO1	MPO2	MPO3	MPO4	MPO5	MPO6	MPO7	MPO8	MPO9	MP910	MPO11
L-Arginina	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L-Asparagina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Cisteína	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
L-Fenilalanina	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Histidina	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
L-Glutamina	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
L-Metionina	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
L-Ornitina	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Serina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Tirosina	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Treonina	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
L-Valina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ positividade para o consumo da fonte; - negatividade para o consumo da fonte.

Figura 21 - Substratos evidenciando a formação de colônias das linhagens de actinobactérias. a. D-sacarose; b. lactose; c. L-arabnose.



Figura 22 - Substratos evidenciando a formação de colônias das linhagens de actinobactérias. a. L-cisteína; b. L-histidina; c. L-glutamina.



As actinobactérias apresentam variado metabolismo, produzindo enzimas extracelulares capazes de hidrolisar diversos substratos para obtenção de carbono e nitrogênio, necessários para o crescimento celular (KENNEDY, 1999).

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os obtidos por (OLIVEIRA, 2015) com 7 linhagens de actinobactérias rizosféricas com potencial antimicrobiano, as quais utilizam preferencialmente o substrato contendo D – trealose, sacarose, D – rafinose, D – lactose, D – galactose, D – sorbitol, D - manitol, Mio – inositol, glicerol e glicose , como fonte de carbono, e L-serina, L – asparagina, L – alanina, L – arginina, L – glutamina e L – histidina, como fonte de nitrogênio.

5.6 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl

As actinobactérias isoladas cresceram preferencialmente em meio basal de sais entre 3 e 5% de NaCl. A linhagem mais tolerante à salinidade foi *Streptomyces* MPO7, desenvolvendo micélio aéreo no meio de cultura contendo NaCl entre 3 e 9% (Tabela 17).

Tabela 17 – Avaliação de crescimento das linhagens de actinobactérias em diferentes concentrações de NaCl.

Concentrações de NaCl	MPO1	MPO2	MPO3	MPO4	MPO5	MPO6	MPO7	MPO8	MPO9	MPO10	MPO11
10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9%	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
8%	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
7%	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
6%	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ positividade para o crescimento; - negatividade para o crescimento.

5.7 Características bioquímicas e fisiológicas das actinobactérias isoladas

As técnicas de microbiologia clássica foram utilizadas para caracterização bioquímica das linhagens possibilitando traçar um perfil da comunidade bacteriana presente na amostra de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (macacaporanga).

Todas as linhagens produzem Catalase, entretanto, nenhuma linhagem produz Urease, H₂S, Indol, CO₂, além de não utilizam citrato como fonte de carbono para o crescimento e não descarboxilarem a lisina. As linhagens MPO3 e MPO5 foram positivas para a descarboxilação da ornitina (Tabela 18).

A maioria dos gêneros que compreende o grupo das actinobactérias é aeróbia, entretanto, existem também os anaeróbios e anaeróbios facultativos (ARAUJO, 1998). A presença predominante da catalase é uma característica da maior parte dos representantes do grupo das actinobactérias, como observado para o gênero *Streptomyces*, os quais apresentam a enzima citocromo oxidase a, b e c, sendo que esta atividade é muito maior nos esporos do que no micélio vegetativo, diferentemente do que ocorre em *Thermoactinomyces*, o qual apresenta baixo teor de citocromo a (ENSIGN, 1978; KENNEDY, 1999).

Tabela 18 - Características bioquímicas das actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga).

Enzimas	Linhagens										
	MPO1	MPO2	MPO3	MPO4	MPO5	MPO6	MPO7	MPO8	MPO9	MPO10	MPO11
Amilase	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Caseinase	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Esterase	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Pectinase	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descarboxilação L-triptofano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descarboxilação Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descarboxilação Ornitina	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de Gás (CO ₂)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L- Glutaminase	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Hemólise	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

+ positividade para o crescimento; - negatividade para o crescimento.

As linhagens MPO1, MPO3, MPO4, MPO6, MPO8, MPO9, MPO10 e MPO11 produzem amilase (Tabela 19) (Figura 23).

Figura 23 - Linhagens de actinobactérias produtoras de amilase. a. *Streptomyces* sp. MPO4; b. *Streptomyces* sp. MPO9.

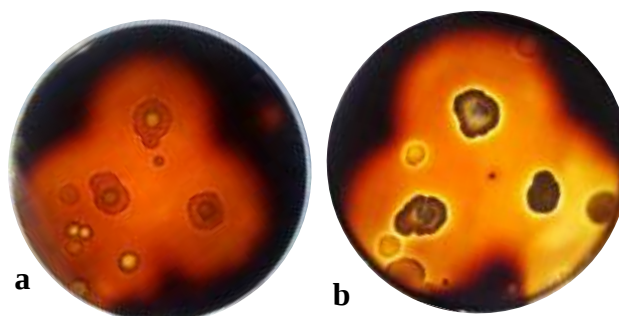


Tabela 19 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de amilase.

Linhagem	Halo enzimático	Diâmetro da colônia
<i>Streptomyces</i> sp. MPO1	32,3	14
<i>Streptomyces</i> sp. MPO3	21,6	18
<i>Streptomyces</i> sp. MPO4	38,3	11,6
<i>Microbacterium xylanyliticum</i> MPO6	23	23
<i>Streptomyces</i> sp. MPO8	15,6	14,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO9	45	12,3
<i>Streptomyces</i> sp. MPO10	12	10,3
<i>Streptomyces</i> sp. MPO11	33,6	14,1

O amido é um polissacarídeo de reserva do reino vegetal e as amilases constituem um grupo de enzimas produzidas por vegetais, animais e micro-organismos que possuem ação sobre esse carboidrato (GUPTA *et al.*, 2003), capaz de hidrolisar as ligações α - glucosídicas do amido.

As amilases microbianas estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas e têm sido alvo de estudos biotecnológicos, uma vez que representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais (SHARMA e SATYANARAYANA, 2013), compondo cerca de 25 a 33% do mercado mundial de enzimas (NGUYEN *et al.*, 2002). A produção de enzimas microbianas tem apresentado ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade genética, e a produção de amilases microbianas é restrita a um número reduzido de micro-organismos,

incluindo as actinobactérias (ALTAMIRANO *et al.*, 2000; SIQUEIRA e MOREIRA, 2001; SINGH, KUMAR e KAPOOR, 2014).

Várias amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e por satisfazerem às exigências industriais, tem substituído quase que completamente a hidrólise química do amido na indústria de processamento de amido (PANDEY *et al.*, 2000). As amilases apresentam inúmeras aplicações industriais, como no processo de liquefação do amido e melhoramento da farinha para a indústria de panificação, na fermentação (SHARMA e SATYANARAYANA, 2013), na produção de amido modificado para a indústria do papel (GUPTA *et al.*, 2003).

Os micro-organismos que compõem a microbiota do solo capazes de produzir enzimas hidrolíticas como amilases, afeta diretamente a disponibilidade de nutrientes para as plantas e outros micro-organismos, bem como as propriedades físico-químicas dos solos (JEFFREY *et al.*, 2007). Esta habilidade enzimática tem sido descrita frequentemente para o grupo das actinobactérias ativas durante o processo de decomposição de matéria orgânica, classificando-as como bactérias eficientes na degradação do amido. São também descritos a produção de ácidos orgânicos, CO₂ e dextrinas (SIQUEIRA e MOREIRA, 2001).

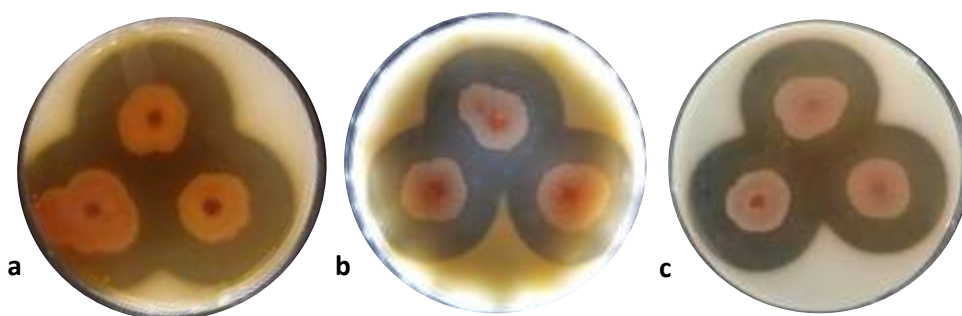
O filo Actinobactéria produz uma diversidade de enzimas como estratégia para a obtenção de fontes de carbono e nitrogênio, entre elas destacam-se a produção de enzimas hidrolíticas como amilase, disponibilizando este polissacarídeo como fonte de carbono (KORN-WENDISCH *et al.*, 1992). Vários estudos descrevem a produção de amilases por actinobactérias, como as α -amilases termoestáveis produzidas por actinobactérias endofíticas do gênero *Nocardiopsis* sp. (STAMFORD *et al.*, 2002) e a bactéria termofílica *Streptomyces* sp. MSC702 (SINGH, KUMAR e KAPOOR, 2014) e a glucoamilase, produzida pelo endofítico *Streptosporangium* sp. (STAMFORD *et al.*, 2002).

As actinobactérias isoladas produzem proteases, sendo que a linhagem MPO1 produz apenas caseinase e a linhagem MPO6 produz apenas gelatinase (Tabela 20) (Figura 24).

Tabela 20 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de Caseinase.

Linhagem	Halo enzimático	Diâmetro da colônia
<i>Streptomyces</i> sp. MPO1	22,6	16,3
<i>Streptomyces</i> sp. MPO2	42,6	22,3
<i>Streptomyces</i> sp. MPO3	48,6	18,3
<i>Streptomyces</i> sp. MPO4	40,3	18,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO5	42,3	16,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO7	34,8	20,1
<i>Streptomyces</i> sp. MPO8	48,3	23,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO9	23,3	14,0
<i>Streptomyces</i> sp. MPO10	27,0	16,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO11	26,3	15,6

Figura 24 - Actinobactérias produtoras de caseinase. a. *Streptomyces* sp. MPO3, b. *Streptomyces* sp. MPO4, c. *Streptomyces* sp. MPO8.



Algumas actinobactérias hidrolisam o substrato contendo caseína e gelatina como descrito no trabalho realizado por OLIVEIRA (2015), quando avaliou o potencial antimicrobiano e citotóxico de actinobactérias isoladas de vários habitats. Das 19 linhagens isoladas, 7 desempenharam maior atividade antagônica e foram submetidas à produção de metabólitos antimicrobianos em meio líquido. O potencial enzimático também foi avaliado e foi observado que as 7 linhagens produzem esterase e caseinase. Apenas uma linhagem não produz lipase e uréase, e todas elas foram catalase positiva.

As linhagens MPO2, MPO5, MPO6, MPO10 e MPO11 produziram lipase com hidrólise do substrato contendo Tween 20 e Tween 80, e somente a linhagem MPO8 não produz lipases e esterases (Tabela 21 e 22). As linhagens MPO3, MPO4, MPO7 e MPO9 hidrolisaram o substrato com Tween 80 (Figura 25) e as linhagens MPO3, MPO4 e MPO7 hidrolisam o Tween 20, e a linhagem MPO8 não produz lipase e/ou esterase (Figura 26).

Figura 25 – Linhagens de actinobactérias produtoras de lipase. a. MPO2, b. MPO4, c. MPO6.

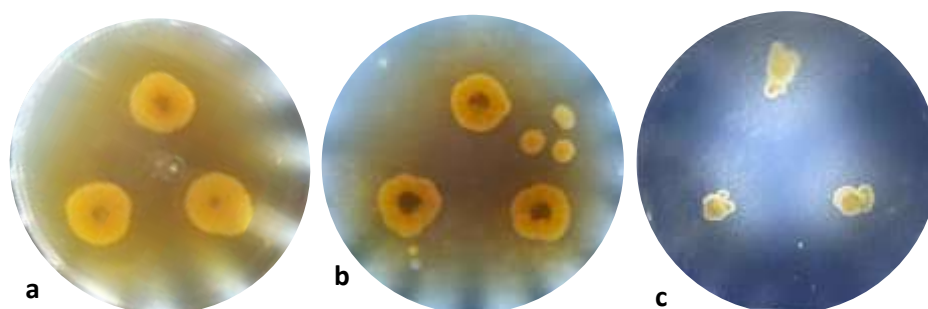


Tabela 21 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de lipase.

Linhagem	Halo enzimático	Diâmetro da colônia
<i>Streptomyces</i> sp. MPO2	34,6	15,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO3	27,1	18,1
<i>Streptomyces</i> sp. MPO4	33,0	16,3
<i>Streptomyces</i> sp. MPO5	24,6	10,3
<i>Microbacterium xylanilyticum</i> MPO6	42,5	12,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO7	21,1	25,1
<i>Streptomyces</i> sp. MPO9	30,8	13
<i>Streptomyces</i> sp. MPO10	30,6	12,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO11	35,3	7,6

Figura 26 - Linhagens de actinobactérias produtoras de esterase. a. MPO1, b. MPO2, c. MPO6.

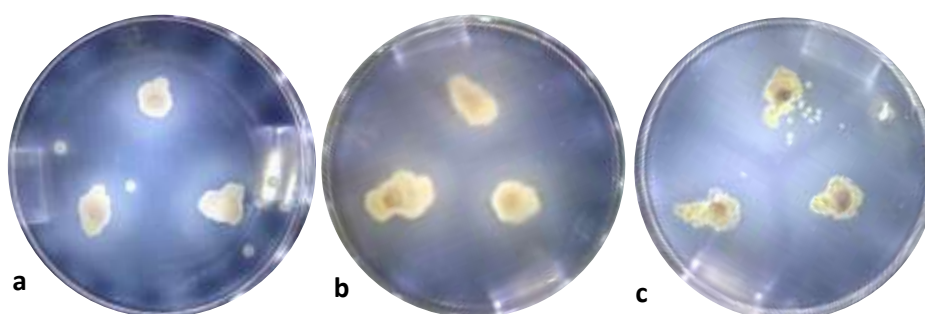


Tabela 22 - Valores dos halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de esterase.

Linhagem	Halo enzimático	Diâmetro da colônia
<i>Streptomyces</i> sp. MPO1	22,5	11,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO2	30,0	15,8
<i>Streptomyces</i> sp. MPO5	20,0	10,6
<i>Microbacterium xylanilyticum</i> MPO6	35,0	17,7
<i>Streptomyces</i> sp. MPO10	30,5	16,0
<i>Streptomyces</i> sp. MPO11	30,3	11,3

As lipases são enzimas catalisadoras da hidrólise de uma diversidade de lipídeos na natureza e apresentam peso molecular entre 19 kDa e 60 kDa (JAEGER, K.-E. e REETZ, M. T., 1998). As carboxilesterases apresentam amplo espectro de substrato sobre ésteres e tioésteres, e também, hidrolases, sendo que a ação das esterases (EC 3.1.1.1) está limitada à hidrólise de substratos hidrossolúveis de cadeia curta como triglicerídeos, enquanto que as lipases (EC 3.1.1.3) hidrolisam substratos mais hidrofóbicos como acilgliceróis de cadeia longa, sendo, portanto, consideradas como enzimas lipolíticas e esterolíticas (JAEGER, K. E. e REETZ, M. T., 1998; KARPUSHOVA *et al.*, 2005).

As lipases e esterases são produzidas por animais, plantas e micro-organismos (SZTAJER, MALISZEWSKA e WIECZOREK, 1988) e apresentam grande potencial de aplicação biotecnológica em processos químicos orgânicos, formulação de detergentes, e na síntese de surfactantes e na indústria têxtil (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006). Além do mais estas enzimas são utilizadas na agroquímica, na fabricação do papel, em nutrição, cosméticos e processos farmacêuticos (BERDY, 2005; COLLA *et al.*, 2010). São também empregadas na produção de biocombustíveis (TAN *et al.*, 2010) além de sua utilização em biocatálise estereoespecífica e na transesterificação de ácidos graxos com álcoois de cadeia curta (TAN *et al.*, 2010).

As lipases e esterases de origem microbiana são biocatalisadores que chamam bastante atenção devido as suas propriedades bioquímicas e aplicações industriais (JOSEPH, RAMTEKE e THOMAS, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010), pois atuam em condições brandas, são estáveis em solventes orgânicos, não necessitam de cofactores, possuem ampla especificidade de substrato e são biodegradáveis (JAEGER, K.-E. e REETZ, M. T., 1998; PANDEY *et al.*, 1999; STAMFORD *et al.*, 2002).

A maior parte das lipases microbianas de uso comercial são isoladas de fungos dos gêneros *Rhizomucor*, *Rhizopus* (AÇIKEL, ERŞAN e AÇIKEL, 2010), *Aspergillus terreus* (GULATI, SAXENA e GUPTA, 1997) e *Candida*, e também de bactérias do gênero *Bacillus* (IMAMURA e KITaura, 2000; KADEMI *et al.*, 2000; KAMBOUROVA *et al.*, 2003), *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (SNELLMAN, SULLIVAN e COLWELL, 2002), *Microbacterium* (HONDA *et al.*, 2002), *Geobacillus* (LI e ZHANG, 2005), *Chromobacterium* (SZTAJER, MALISZEWSKA e WIECZOREK, 1988; SCHMID e VERGER, 1998) e *Streptomyces* (SOMMER, BORMANN e GÖTZ, 1997; ABRAMIĆ *et al.*, 1999). Contudo, as novas aplicações das enzimas ampliaram a pesquisa em direção às fontes enzimáticas inexploradas para obtenção de lipases de origem microbiana como as produzidas por actinobactérias do gênero *Streptomyces* (SZTAJER, MALISZEWSKA e WIECZOREK, 1988; YUAN *et al.*, 2014).

As actinobactérias são reconhecidas pela produção de diversas enzimas extracelulares, inclusive lipases e esterases (SZTAJER, MALISZEWSKA e WIECZOREK, 1988; GANDOLFI *et al.*, 2000; VUJAKLIJA *et al.*, 2002; DHEEMAN, FRIAS e HENEHAN, 2010; QIN *et al.*, 2012; ZOTCHEV, 2012). Neste grupo, o gênero *Streptomyces* apresenta uma vantagem competitiva em relação a outros micro-organismos, pois produz inúmeros metabólitos secundários bioativos como antibióticos e enzimas líticas de ação direta sobre a parede celular microbiana. Apresentam também resistência contra compostos tóxicos presentes no solo como pesticidas organoclorados, triazinas simétricas e acetilidas (SCHRIJVER e Mot, 1999).

Em estudo realizado por DUARTE (2012) com o isolamento de actinobactérias em solos impactados e não impactado com petróleo, foi registrado que a maioria dos isolados de actinobactérias rizosféricas produzem lipase e esterase. Nesse estudo foram escolhidos 2 isolados de actinobactérias produtoras de lipase e esterase, os quais foram capazes de crescer em meio sólido na presença de diesel (B10) e Biodiesel (B100). Após a identificação molecular foi confirmado que estes isolados pertencem ao gênero *Streptomyces* sp.

As lipases estáveis em diferentes condições de pH, temperatura, ativas em diversos solvente orgânicos tem sido alvo da indústria biotecnológica como observado por (MANDER *et al.*, 2012) que isolaram uma lipase com massa molecular de 39,8 kDa proveniente de *Streptomyces* sp. CS133 capaz de atuar na transesterificação enzimática de óleos vegetais.

No estudo realizado por (CHO *et al.*, 2012) a partir do isolamento de 700 micro-organismos do solo com potencial biotecnológico na produção de biodiesel foi selecionado a linhagem *Streptomyces* CS326, produtora de uma nova lipase altamente indutível com detergente e estável na presença de vários solventes, incluindo metanol.

As linhagens MPO1, MPO3, MPO4, MPO6 e MPO9 produzem pectinase conforme apresentado na figura 27 e tabela 23.

Figura 27 - Linhagens de actinobactérias produtoras de pectinase. a. MPO1; b. MPO4, c. MPO6.

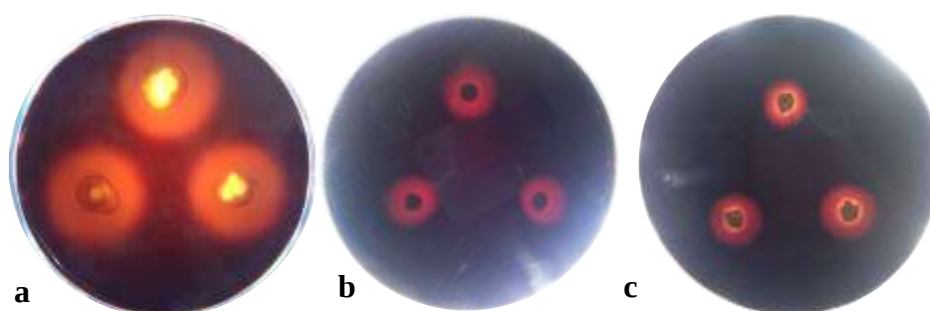


Tabela 23 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de pectinase.

Linhagem	Halo enzimático	Diâmetro da colônia
<i>Streptomyces</i> sp. MPO1	31,5	14,3
<i>Streptomyces</i> sp. MPO3	37,3	18,3
<i>Streptomyces</i> sp. MPO4	14,8	5,0
<i>Microbacterium Xylanilyticum</i> MPO6	37,5	16,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO9	15,5	6,0

As pectinases são enzimas líticas que hidrolisam compostos pécticos, são produzidas por fungos, bactérias e vegetais (WHITAKER, 1990). Sua ação enzimática nos tecidos vegetais, onde estão presentes compostos pécticos como pectato de cálcio e pectato de magnésio (KASHYAP *et al.*, 2002). Estas enzimas líticas são ativas no processo de compostagem, a partir da degradação de matéria orgânica, contribuindo para o ciclo natural do carbono (WEI *et al.*, 2000; PEDROLLI *et al.*, 2009).

As pectinases têm atraído a atenção por sua aplicação biotecnológica como catalisador biológico em diversos processos industriais, com grande aplicação na indústria alimentícia para a fabricação de sucos (KASHYAP *et al.*, 2000), no processo de fermentação de chás e na redução de espuma (CARR, 1985), na produção de vinho como clarificador e

estabilizador da cor do vinho tinto (REVILLA e José, 2003), na produção de ração animal, promovendo a diminuição de viscosidade e aumento de absorção de nutrientes e hidrolisando fibras não biodegradáveis e consequentemente liberação de seus nutrientes constituintes (HOONDAL *et al.*, 2002; RASHMI *et al.*, 2008). São também utilizadas na indústria do papel (BEG *et al.*, 2001; VIIKARI, TENKANEN e SUURNÄKKI, 2008).

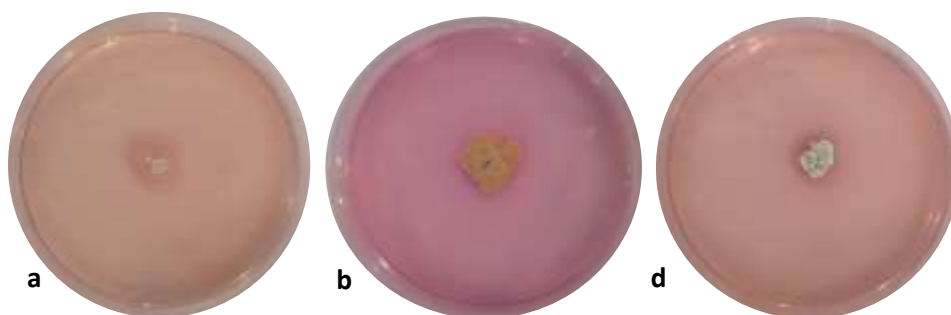
Estas enzimas são classificadas de acordo com o seu modo de ação sobre os polímeros pécticos, podendo atuar nas extremidades da cadeia da molécula de pectina (exo), ou de forma aleatória no interior da cadeia (endo), sendo destaque as pectinases com ação de despolimerização da cadeia principal da pectina, devido a sua ação sobre ligações glicosídicas α -(1,4) entre os monômeros galacturônicos através da hidrólise (poligalacturonases) quanto pela pectina liase (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005).

As pectinases microbianas de uso comercial são obtidas principalmente de fungos como *Aspergillus niger* (Naidu e Panda, 1998; Singh, Ramakrishna e Rao, 1999) e são responsáveis por cerca de 25% do total de enzimas aplicadas na preparação de alimentos (KASHYAP *et al.*, 2002).

A produção de pectinases por actinobactérias foi descrita para o gênero *Streptomyces* sp. e *Thermomonospora* sp. (STUTZENBERGER, 1987), principalmente as pectato liases produzidas por *Streptomyces viridochromogenes* (AGATE, BHAT e BILIMORIA, 1962) e *Thermomonospora fusca* (STUTZENBERGER, 1987).

Todas as linhagens de actinobactérias isoladas produzem L- Glutaminase (Figura 28), exceto MPO9, e a intensidade da coloração nas placas de ensaio com as diferentes linhagens sugere diferença na quantidade de enzima secretada (GULATI, SAXENA e GUPTA, 1997; BALAGURUNATHAN, RADHAKRISHNAN e SOMASUNDARAM, 2010b).

Figura 28 - Linhagens de actinobactérias produtoras de L-glutaminase. a. *Streptomyces* sp. MPO5, b. *Microbacterium xylanilyticum* MPO6.



A enzima L-glutaminase (E.C. 3.5.1.2) apresenta atividade antitumoral, especialmente contra leucemia linfocítica aguda (LLA) (ROBERTS *et al.*, 2001; KOIBUCHI *et al.*, 2004) e atividade antiviral contra HIV (SABU *et al.*, 2000) (PLNSN *et al.*, 2014). É também utilizada na indústria de alimentos, tendo sua aplicação na intensificação de sabor, uma vez que aumenta o teor de ácido glutâmico nos alimentos em decorrência da hidrólise da glutamina.

As L-glutaminases microbianas podem ser produzidas por diversos micro-organismos que ocorrem no solo como, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp, *Bacillus* sp, *Cryptococcus* sp, *Candida* sp, *Aspergillus* sp. (PALLEM, MANIPATI e SOMALANKA, 2010), *Beauveria bassiana* (SABU, 2003). A produção de L-glutaminases também tem sido descrita por actinobactérias como *Streptomyces canarius* (BALAGURUNATHAN, RADHAKRISHNAN e SOMASUNDARAM, 2010a).

A seleção de micro-organismos produtores de L-glutaminases pode ser feita em meio sólido contendo o substrato glutamina e o corante vermelho de metila, o qual indicará através da mudança de cor do meio de cultura inicialmente amarelo claro para tons de vermelho, em decorrência da ação enzimática. Neste estudo apenas um isolado de actinobactérias não foi positivo para a produção de L-glutaminase, e também a intensidade de cor observada nas placas teste variou em tons de rosa-claro à rosa escuro. Essa variação na intensidade da cor rosa, indica positividade para produção da enzima e também diferentes quantidades de enzima secretada pelo micro-organismo (GULATI, SAXENA e GUPTA, 1997; BALAGURUNATHAN, RADHAKRISHNAN e SOMASUNDARAM, 2010b).

Saxena et al. (2015) isolaram actinobactérias do solo e avaliaram o potencial destas bactérias filamentosas em produzir as enzimas antitumorais L-asparaginase e L-glutaminase e identificaram que dos 57 isolados que apresentaram excelente e boa produção de L-asparaginase, 51 isolados produziram L-glutaminase.

A enzima L-asparaginase (EC 3.5.1.1) é uma amino-hidrolase de ação sobre a L-asparagina, reduzindo-a à aspartato, com liberação de uma molécula de amônia. É uma enzima com propriedade antitumoral sintetizada por animais, vegetais, leveduras (KIL, KIM e PARK, 1995), algas, e principalmente bactérias, como *Staphylococcus aureus* (Muley *et al.*, 1998), *Corynebacterium glutamicum* (MESAS, GIL e MARTIN, 1990), *Enterobacter cloacae*, *Erwinia carotovora*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter aerogenes* (MUKHERJEE,

MAJUMDAR e SCHEPER, 2000), sendo que as obtidas de *E. coli* (CLAVELL *et al.*, 1986; DERST *et al.*, 1994; MERCADO e ARENAS, 1999) e *Erwinia carotovora* (MALADKAR, SINGH e NAIK, 1993; AGHAIYPOUR, WLODAWER e LUBKOWSKI, 2001) são as mais exploradas (HOWARD E CARPENTER, 1972; OZA *et al.*, 2011; ALI *et al.*, 2015).

As propriedades anti-proliferativas de L-asparaginase sobre células tumorais foram inicialmente descritas na década de 1970, e sua aplicação tem sido uma alternativa terapêutica no tratamento da leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda (LLA)(PIETERS *et al.*, 2011), doença de Hodgkin's, linfomas de células T e alguns tipos de leucemia mielóide (NARTA, KANWAR e AZMI, 2007). Esta enzima apresenta ação seletiva, proporcionando estado de jejum às células tumorais que são incapazes de sintetizar o aminoácido L-asparagina devido à falta da enzima ligase aspartato-amônia (NARTA, KANWAR e AZMI, 2007; GURUNG *et al.*, 2013).

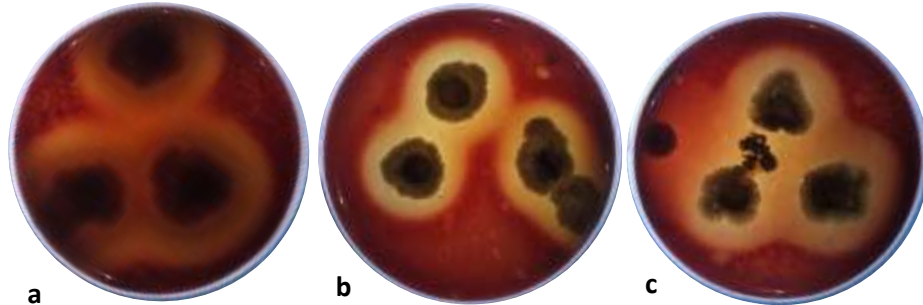
As actinobactérias também apresentam grande potencial na produção de L-asparaginases, como as produzidas por *Mycobacterium tuberculosis* (KIRCHHEIMER E WHITTAKER, 1954), *Streptomyces karnatakensis*, *Streptomyces venezuelae* (MOSTAFA e SALAMA, 1979), *Streptomyces albioflavus* (NARAYANA, KUMAR E VIJAYALAKSHMI, 2008), *Streptomyces gulbargensis* (AMENA *et al.*, 2010) e *Streptomyces* sp. NEAE-119 isolado do solo do Egito (EL-NAGGAR *et al.*, 2015).

Todas as linhagens, exceto a MPO9 produzem hemolisinas (Tabela 24) (Figura 29).

Tabela 24 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de actinobactérias produtoras de hemólise.

Linhagens	Halo enzimático	Diâmetro da colônia
<i>Streptomyces</i> sp. MPO1	28,5	16,5
<i>Streptomyces</i> sp. MPO2	44,2	14,5
<i>Streptomyces</i> sp. MPO3	19,3	11,8
<i>Streptomyces</i> sp. MPO4	23,5	12,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO5	30,8	12,6
<i>Microbacterium xylanilyticum</i> MPO6	11,2	9,1
<i>Streptomyces</i> sp. MPO7	41	17,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO8	38,6	15,6
<i>Streptomyces</i> sp. MPO10	18,2	11,0
<i>Streptomyces</i> sp. MPO11	18,6	9,6

Figura 29 - Actinobactérias produtoras de hemólise em Meio Agar sangue. a. *Streptomyces* sp. MPO1, b. *Streptomyces* sp. MPO3, c. *Streptomyces* sp. MPO4.



Após a triagem para a produção das enzimas de interesse industrial, foi determinado o índice enzimático para determinação do potencial enzimático das linhagens de actinobactérias, sendo considerado como bom potencial enzimático aquelas que apresentaram índice enzimático acima de 1,5.

As linhagens que se destacaram quanto ao potencial enzimático foram MPO4 para produção de amilase, MPO3 para produção de caseinase, MPO6 para produção de lipase, MPO2 para produção de esterase e MPO4 para produção de pectinase (Tabela 5).

Tabela 25 - Determinação do índice enzimático (IE) das linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga).

Enzima	Linhagem										
	MPO1	MPO2	MPO3	MPO4	MPO5	MPO6	MPO7	MPO8	MPO9	MPO10	MPO11
Lipase	-	2,2	1,5	2	2,4	3,4	1,2	-	2,3	2,4	4,6
Caseinase	1,4	1,9	2,6	2,1	2,5	-	1,7	2,0	1,6	1,6	1,7
Amilase	2,3	-	1,2	3,3	-	1,3	-	1,0	3,6	1,1	2,4
Esterase	1,9	2,1	-	-	1,9	2,0	-	-	-	1,9	2,7
Pectinase	2,2	-	2,0	3,0	-	2,2	-	-	2,6	-	-
Hemolisina	1,7	3,0	1,6	1,8	2,4	1,2	2,3	2,5	-	1,6	1,9

- ausente

O potencial biotecnológico de actinobactérias na produção de enzimas de interesse industrial foi descrito por Karanja et al. (2012), a partir da avaliação da produção de lipases por *Streptomyces*, apresentando índice enzimático (IE) para lipase e esterase de 5.3 e 4.2, respectivamente.

5.8 Atividade antimicrobiana

Foi observado efeito antagonístico das actinobactérias contra os patógenos testados, exceto MPO4, MPO9, MPO10 e MPO11. A intensidade de atividade antimicrobiana variou entre os isolados, sendo observada ação sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos leveduriformes e filamentosos (Tabela 26).

No geral, todas as linhagens de actinobactérias foram ativas a pelo menos um dos micro-organismos testados no ensaio primário de antagonismo, exceto a linhagem MPO4. Das 8 actinobactérias testadas, 5(62,5%) foram ativas contra *Candida albicans*, apenas, sendo 4 *Streptomyces* sp. e 1 *Microbacterium xylanilyticum*. Apenas duas cepas de *Streptomyces* sp. foram ativas contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Fusarium* sp.

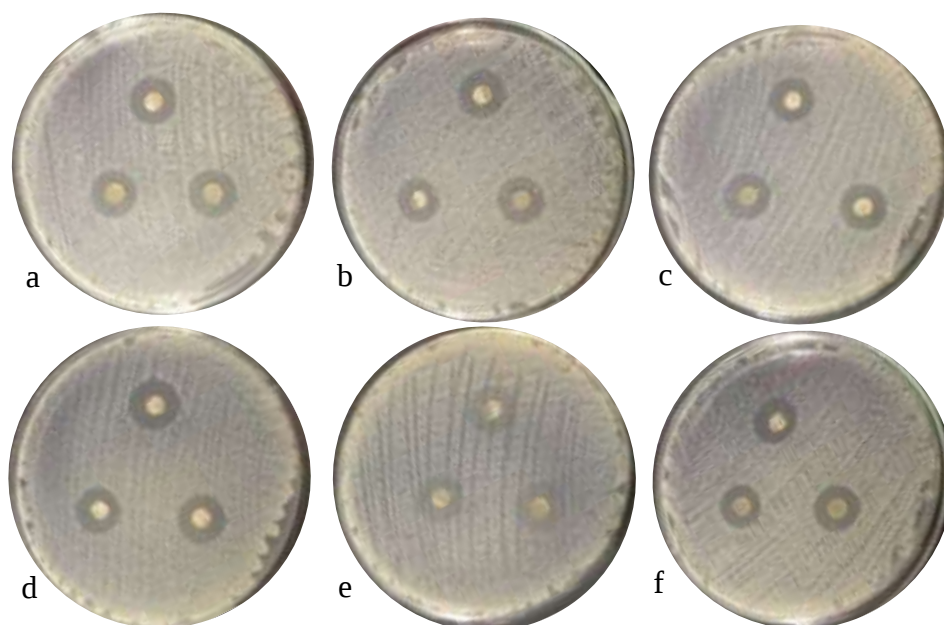
Tabela 26 - Atividade antimicrobiana das actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga).

Micro-organismo	Linhagens de actinobactérias						
	MPO1	MPO2	MPO3	MPO5	MPO6	MPO7	MPO8
<i>Staphylococcus aureus</i> – 02	16,6±0,58	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> - 800	16,3±0,58	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 183	17,6±0,58	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> – 138	12,3±0,58	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	17,3±0,58	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> – 415	17 ± 1,0	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> – 352	12,6±0,58	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia sp</i> – 398	15,6±0,58	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	15 ± 0,0	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – 416	9,8±2,1	-	-	-	-	10 ± 0,0	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> – 396	11,6±0,58	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> - 348	12,3±0,58	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> – 767	-	-	-	-	-	-	-
<i>Postia placenta</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium sp</i>	-	-	-	10,6±0,57	-	11,3±0,58	-
<i>Polyporus sanguineus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rizhoctonia solani</i>	-	-	-	-	-	17,3±0,58	18,6±1,15
<i>Candida albicans</i> - 1007	10,6±0,92	12,6±0,58	14,6±2,3	17,3±0,58	17,6±0,58	-	11,6±0,58
<i>Candida krusei</i> – 1002	11,4±1,15	10,6±0,58	-	-	-	-	10,3±0,58
<i>Candida sp</i>	17± 0,0	-	-	-	-	-	-

- Negativo

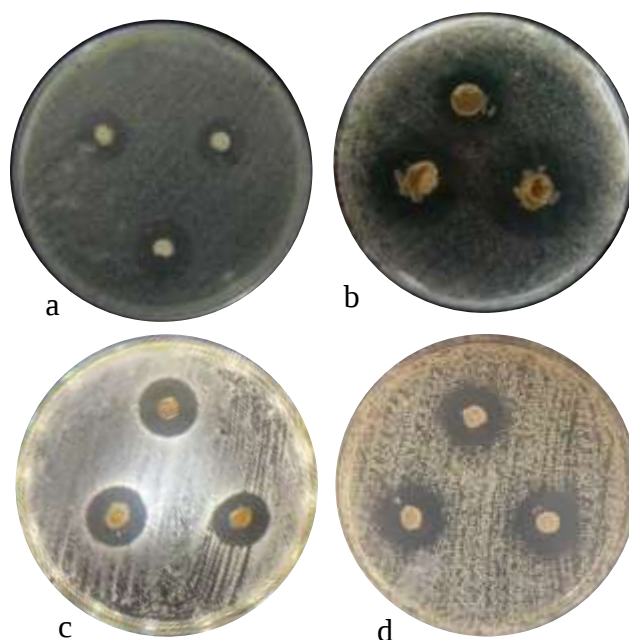
Streptomyces sp. MPO1 apresentou maior efeito antagonístico contra 15(71,4 %) patógenos testados, indicando produção de metabólitos secundários com espectro de ação sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras. Foi registrado alta atividade antimicrobiana para o gênero *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, com maior atividade contra *S. epidermidis*, com halo de inibição de 17,6 mm, e baixa atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* com halo de inibição de 9,8 mm (Figura 30).

Figura 30 - Atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. MPO1. a. *Staphylococcus aureus*; b. *S. saprophyticus*; c. *S. epidermidis*; d. *Salmonella enteritidis*; e. *S. liquefaciens*; f. *Serratia* sp.



Streptomyces sp. MPO2, *Streptomyces* sp. MPO3, *Microbacterium xylanilyticum* MPO6 apresentaram efeito antagonístico apenas contra *Candida* sp., sendo que *Streptomyces* sp. MPO2 apresentou halos de inibição de 12,6 mm para *Candida albicans* e 10,6 mm para *Candida krusei*, respectivamente; *Streptomyces* sp. MPO3 apresentou halo de inibição de 14,6 mm para *Candida albicans*; e *Microbacterium xylanilyticum* MPO6 apresentou halo de 17,6 mm para *Candida albicans*. *Streptomyces* sp. MPO5 apresentou antagonismo apenas contra *Candida albicans* com halo de inibição de 17,3 mm, e baixa atividade antifúngica sobre *Fusarium* sp. com halo de inibição de 10,6 mm (Figura 31).

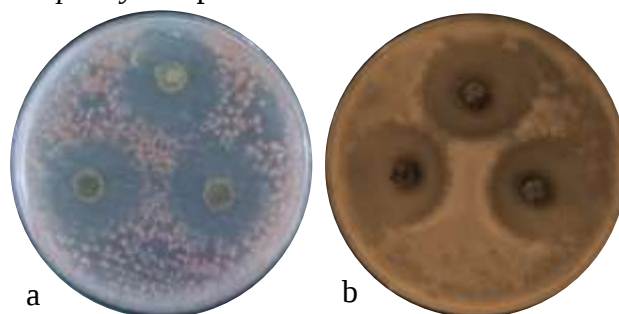
Figura 31 - Atividade antimicrobiana. a. *Streptomyces* sp. MPO2 frente à *Candida albicans*; b. *Streptomyces* sp. MPO1 contra *Candida krusei*; c. *Microbacterium xylanilyticum* MPO6 contra *C. albicans*; d. *Streptomyces* sp. MPO5 contra *Candida albicans*.



Streptomyces sp. MPO7 apresentou baixa atividade para *Pseudomonas aeruginosa*, moderada atividade antifúngica para *Fusarium* sp. e alta atividade para o fungo *Rhizoctonia solani*, com halo de inibição de 17,3 mm.

Streptomyces sp. MPO8 apresentou alta atividade para *Rhizoctonia solani*, com halos de inibição de 18,6 mm, seguido de moderada e baixa atividade contra *Candida albicans* e *Candida* sp., com halos de inibição de 11,6 mm e 10,3 mm, respectivamente (Figura 32).

Figura 32 - Atividade antimicrobiana contra *Rhizoctonia solani*. a. *Streptomyces* sp. MPO7; b. *Streptomyces* sp. MPO8.



Os estudos realizados no presente trabalho avaliando o espectro de ação da linhagem de *Streptomyces* MPO1, mostrou moderada e alta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Esta linhagem mostrou atividade relativa contra as bactérias Gram negativas e baixa atividade antifúngica com halo de inibição variando entre 10 mm e 14 mm para *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* e *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida* sp.

A maioria das linhagens apresentou atividade antifúngica, com destaque para as linhagens MPO8 e MPO7 que apresentaram alta atividade para *Rhizoctonia solani* com halos de 18,6 mm e 17,3 mm, respectivamente.

Em triagem preliminar realizada com actinobactérias isoladas de diferentes solos do cerrado, OLIVEIRA (2015), selecionou 5 dos 16 isolados de actinobactérias, os quais foram ativos contra algum dos micro-organismos testados, incluindo bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos filamentosos e leveduriformes. A investigação de OLIVEIRA (2015) mostrou que a linhagem BC-A22 apresentou halo de inibição semelhante ao observado nesse estudo, contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

A ação antimicrobiana de actinobactérias contra bactérias Gram positivas é comum (ZITOUNI *et al.*, 2005; GUPTA, 2011). Esta atividade ocorre preferencialmente contra Gram positivas, seguido de atividade antifúngica e por último, atividade antibacteriana sobre Gram negativas, como enfatizado por Zitouni *et al.* (2005).

Uma das proposições sustentadas refere-se à diferenças estruturais entre bactérias Gram positivas e Gram negativas, quanto à constituição da parede celular. As bactérias Gram positivas apresentam uma parede celular composta de uma camada espessa de peptidoglicano, não se constituindo uma barreira eficaz à difusão e penetração de moléculas antimicrobianas, diferentemente das bactérias Gram negativas que apresentam uma membrana externa lipopolissacarídica (GEBREYOHANNES *et al.*, 2013).

Outro aspecto importante a ser considerado no processo de triagem de atividade antimicrobiana através da observação do antagonismo em meio sólido é que durante a interação microbiana são produzidas diversas substâncias bioativas, as quais podem atuar de forma sinérgica para a inibição do micro-organismo teste (BASILIO *et al.*, 2003).

O gênero *Streptomyces* é considerado um dos mais importantes agentes no biocontrole de fungos. Esta característica pode estar relacionada devido ao seu grande

potencial na produção de diversos metabólitos antifúngicos (TREJO-ESTRADA, PASZCZYNSKI e CRAWFORD, 1998; FGUIRA *et al.*, 2005) e enzimas hidrolíticas (VUJAKLIJA *et al.*, 2002; MUKHERJEE e SEN, 2006; AÇIKEL, ERŞAN e AÇIKEL, 2010).

5.9 Perfil de sensibilidade a antimicrobianos

Todas as linhagens foram resistentes a Amoxicilina + Clavulanato, Cefepime, Cefazolina, Ceftazidima, Cefuroxima acetil, Nitrofurantoina e Penicilina G, e sensíveis a Amicacina, Ampicilina, Clorafenicol, Gentamicina, Norfloxacin, Estreptomicina, Neomicina, Tetraciclina. A linhagem *Streptomyces* sp. MPO1 foi resistente a 13 (62%) antimicrobianos, seguido da linhagem *Streptomyces* sp. MPO2 que foi resistente a 12 (57,1%) antimicrobianos (Tabela 27).

Tabela 27 - Antibiógrama das linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga).

Actinobactérias isoladas de solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> Syn <i>A. Fragans</i> (Macacaporanga).							
Antibióticos	MPO1	MPO2	MPO3	MPO4	MPO5	MPO6	MPO7
Ácido Nalidixico (30µg)	R	R	S	S	S	S	S
Amicacina (30µg)	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina (10µg)	S	S	S	S	S	S	S
Amoxicilina + Clavulanato (20µg/10 µg)	R	R	R	R	R	R	R
Cefepime (30µg)	R	R	R	R	R	R	R
Cefoxitina (30µg)	R	R	S	R	R	R	R
Cefazolina (30µg)	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidima (30µg)	R	R	R	S	R	R	R
Cefuroxima acetil (30µg)	R	R	R	R	R	R	R
Clindamicina (2µg)	R	R	S	S	S	S	S
Clorafenicol (30µg)	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina (120µg)	S	S	S	S	S	S	S
Eritromicina (15µg)	R	S	S	S	S	S	S
Meropenem (10µg)	R	R	S	R	S	R	S
Norfloxacino (5µg)	S	S	S	S	S	S	S
Estreptomicina (300µg)	S	S	S	S	S	S	S
Nitrofurantoína (300µg)	R	R	R	R	R	R	R
Neomicina (30µg)	S	S	S	S	S	S	S
Penicilina G (10µg)	R	R	R	R	R	R	R
Sulfametoxazol + Trimetoprim (23,75µg/125µg)	R	R	R	R	R	R	S
Tetaciclina (30µg)	S	S	S	S	S	S	S

S – Sensível; R – Resistente.

No presente estudo foi observado que a triagem de atividade antimicrobiana realizada através da avaliação de antagonismo entre as actinobactérias e os patógenos teste revelou sensibilidade de alguns micro-organismos, sendo que em algumas situações como observado para *Streptomyces* sp. MPO1, *Streptomyces* sp. MPO7 e *Streptomyces* sp. MPO8, esta sensibilidade não foi observada durante o processo de fermentação. Possivelmente a constituição do meio não favoreceu a produção dos antibióticos para os respectivos micro-organismos teste.

No geral, os melhores resultados de atividade antimicrobiana foram obtidos entre 48h e 144h de fermentação em meio MPE. O micro-organismo mais sensível ao líquido fermentado foi *Rhizoctonia solani* com halo de inibição de 28,3 mm frente ao líquido obtido das 144h de fermentação em meio MPE de *Streptomyces* sp. MPO8, e MPO2 contra *Candida albicans*, com halo de inibição de 27,6 mm frente ao líquido fermentado de 48 h de fermentação em meio MPE.

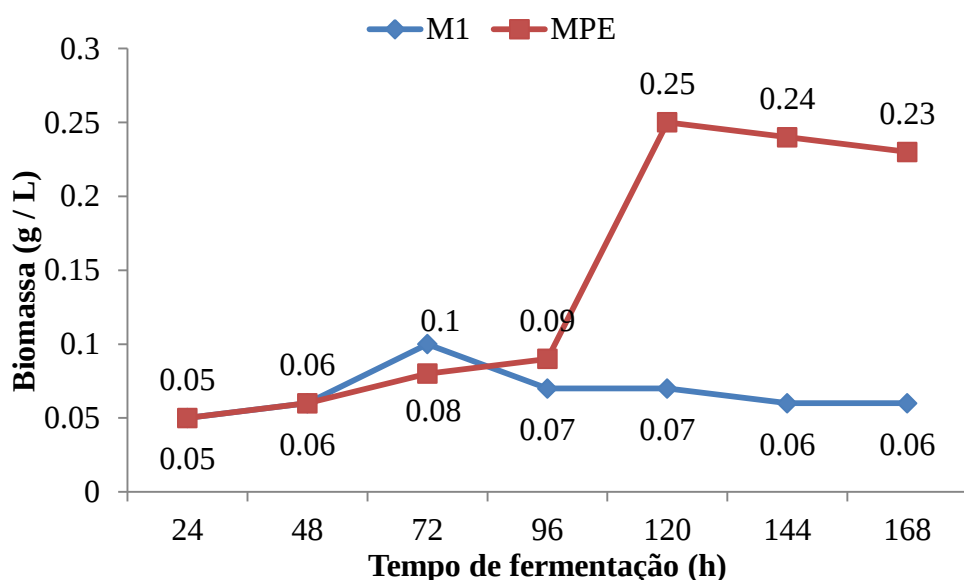
5.10 Curva de produção de metabólitos secundários antimicrobianos

Durante a fermentação de *Streptomyces* sp. MPO1 nos meios M1 e MPE o pH foi tornando-se ácido, variando entre 5,7 a 3,5 no meio M1 e entre 5,0 e 4,4 no meio MPE. No meio MPE foi observado maior valor de biomassa de *Streptomyces* sp. MPO1 entre 96h e 120h. Neste período o pH da fermentação estava ácido entre 3,0 e 3,1. Já no meio M1 ocorreu menor produção de biomassa, com maior produção entre 48h e 72h de fermentação (Figura 34). Neste período o pH da fermentação se apresentou pouco ácido entre 5,4 e 4,8, em relação ao líquido fermentado de MPE (Tabela 28). A produção do antibiótico ocorreu em 96h de fermentação, em meio ácido com pH 4,7, na fase estacionário do crescimento microbiano (Figura 33).

Tabela 28 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de *Streptomyces* sp. MPO1 nos meios M1 e MPE.

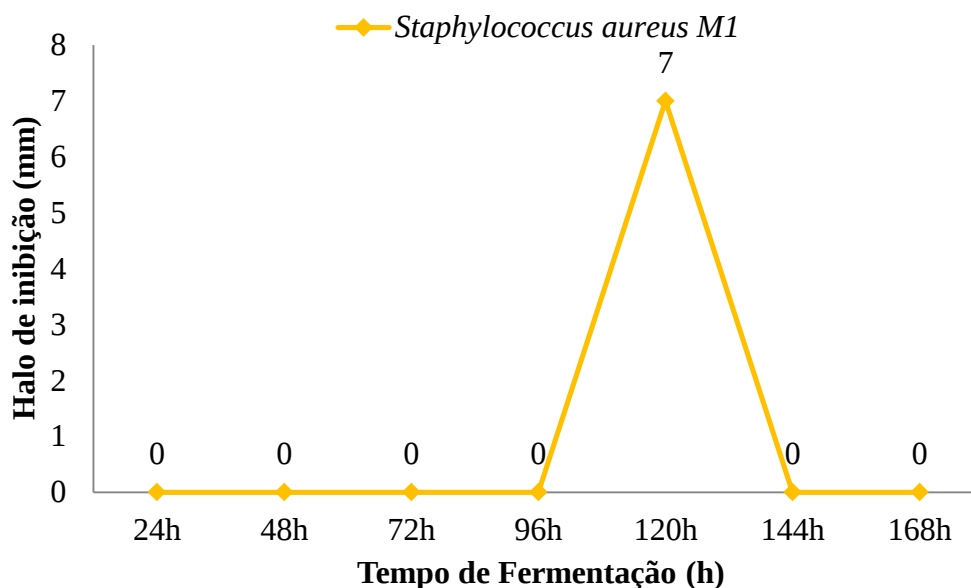
Tempo	Meio M1			Meio MPE		
	Biomassa (g)	pH	T°C	Biomassa (g)	pH	T°C
24	0,05	5,72	24,5	0,05	5,09	24,9
48	0,06	5,4	27,5	0,06	4,72	26,8
72	0,10	4,86	23,9	0,08	4,7	23,8
96	0,07	4,76	24,6	0,10	4,78	23,8
120	0,07	3,65	24,8	0,25	3,04	25,7
144	0,06	4,58	25	0,24	3,18	23,7
168	0,06	3,59	26,3	0,23	4,41	24,3

Figura 33 – Biomassa da fermentação de *Streptomyces* sp.MPO1 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.



Streptomyces sp. MPO1 produziu metabólitos antimicrobianos no meio M1, sendo que apenas a bactéria *Staphylococcus aureus* foi sensível ao líquido fermentado de 120h da fermentação no meio M1, com halo de inibição de 7 mm (Figura 34), diferentemente da ação antimicrobiana observada no ensaio primário de bloco de gelose, onde esta linhagem inibiu 15 dos 21 micro-organismos teste.

Figura 34 - Produção de metabólitos antibacteriano da linhagem MPO1 em meio M1 e MPE durante 168h de fermentação.



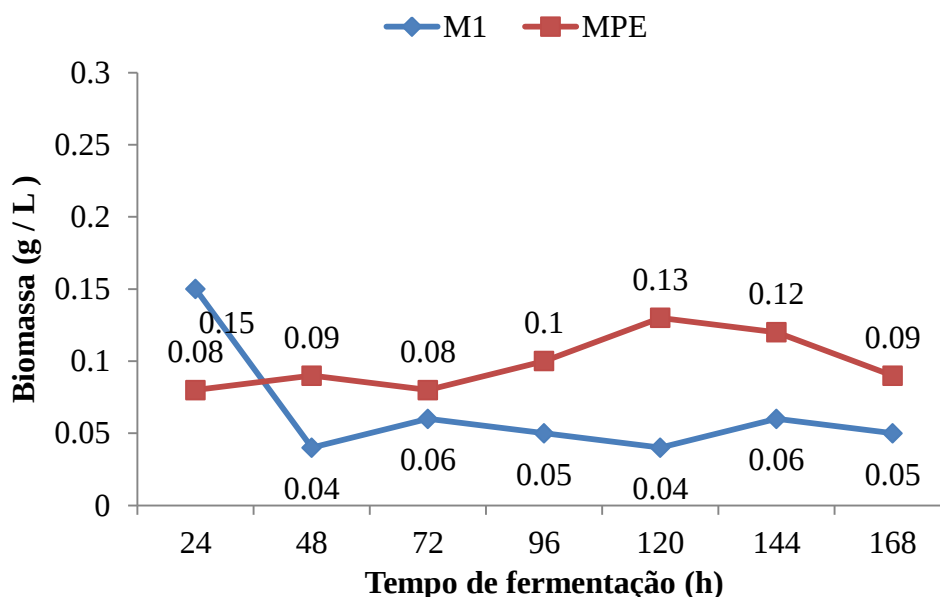
O meio MPE é o melhor meio para produção de metabólitos antifúngicos de *Streptomyces* sp. MPO2. O líquido fermentado entre 48h e 120h foi ativo contra *Candida albicans*, e entre 120h e 168h frente a *Candida krusei*. A levedura *Candida albicans* apresentou alta sensibilidade ao líquido fermentado de 48h, apresentando halo de inibição de 27,6 mm, e *Candida krusei* ao líquido metabólico de 120h, apresentando halo de inibição de 22,6 mm (Tabela 29).

Durante a fermentação de *Streptomyces* sp. MPO2 nos meios M1 e MPE o pH foi variando entre 4,6 a 8,2 no meio M1 e entre 6,16 e 8,17 no meio MPE. No meio M1 foi observado maior biomassa durante as 24h (Figura 35). Neste período o pH da fermentação estava próximo à neutralidade a 6,1. Neste período o pH da fermentação se apresentou ácido a 4,6.

Tabela 29 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de *Streptomyces* sp. MPO2 nos meios M1 e MPE.

Tempo	Meio M1			Meio MPE		
	Biomassa	pH	T°C	Biomassa	pH	T°C
24	0,15	4,64	20,3	0,08	6,16	19,7
48	0,04	7,06	22,8	0,09	7,56	22,3
72	0,06	7,64	22,8	0,08	7,22	24,9
96	0,05	7,87	24,9	0,1	8,11	25,7
120	0,04	7,5	26	0,13	7,59	26
144	0,06	8,23	20,3	0,12	8,17	22,5
168	0,05	7,91	24,5	0,09	7,55	24,9

Figura 35 - Biomassa da fermentação de *Streptomyces* sp. MPO2 em meio M1 e MPE.



Houve produção de antifúngico nos meios M1 e MPE, sendo que o meio líquido fermentado de 48h em meio MPE foi o mais ativo, inibindo *Candida albicans*, seguido do líquido de 120h ativo contra *Candida krusei*. O líquido fermentado em meio M1 foi menos ativo, indicando baixa produção do antifúngico, com melhor atividade em 48h de fermentação para *C. albicans* e 144h para *C. krusei* (Tabela 30)(Figura 36).

Tabela 30 - Halos de inibição (mm) para *Candida albicans* e *Candida krusei* do líquido de *Streptomyces* sp. MPO2 .

Tempo	<i>Candida albicans</i> - 1007		<i>Candida krusei</i> – 1002	
	Meio M1	Meio MPE	Meio M1	Meio MPE
24h	-	-	-	-
48h	13,3±0,58	27,6±0,58	-	-
72h	11,6±0,58	25,3±0,58	-	-
96h	12,6±0,58	18,3±0,58	-	-
120h	8,6±0,58	16,3±0,58	-	22,6±0,58
144h	-	-	15,3±0,58	20,3±0,58
168h	-	-	12,6±0,58	20±0,0

- sem atividade

O pH variou entre 5,79 e 7,16 durante a fermentação de *Streptomyces* sp. MPO3 no meio MPE, tornando-se levemente ácido em 144h com ph 5,7. No meio M1 o pH variou entre 5,5 e 6,87. Não houve bom desenvolvimento de biomassa nos meios M1 e MPE, com aumento da biomassa em 48h para o meio MPE e em 168h no meio M1 (Tabela 31) (Figura 37).

Figura 36 - Biomassa da fermentação de *Streptomyces* sp. MPO2 em meio M1 e MPE.

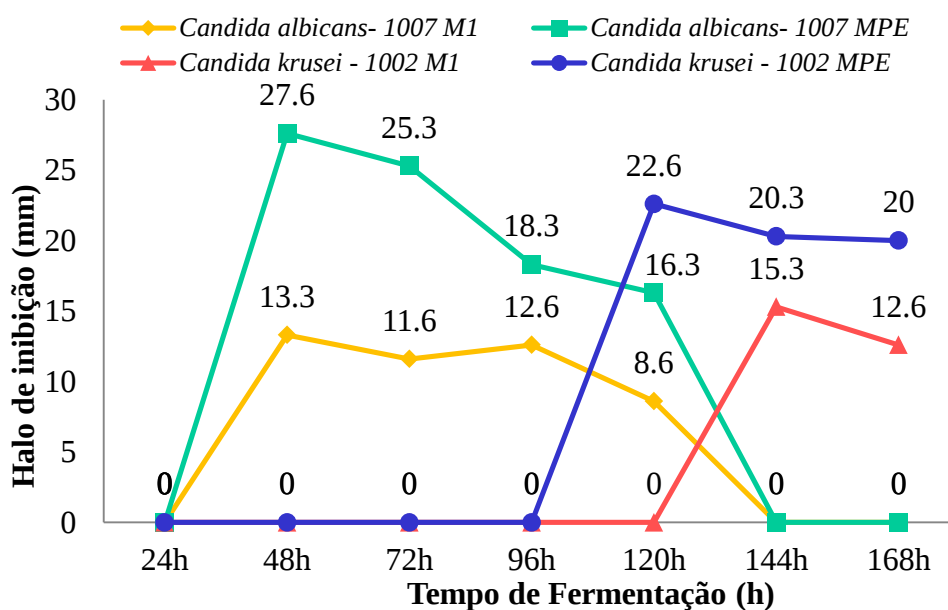
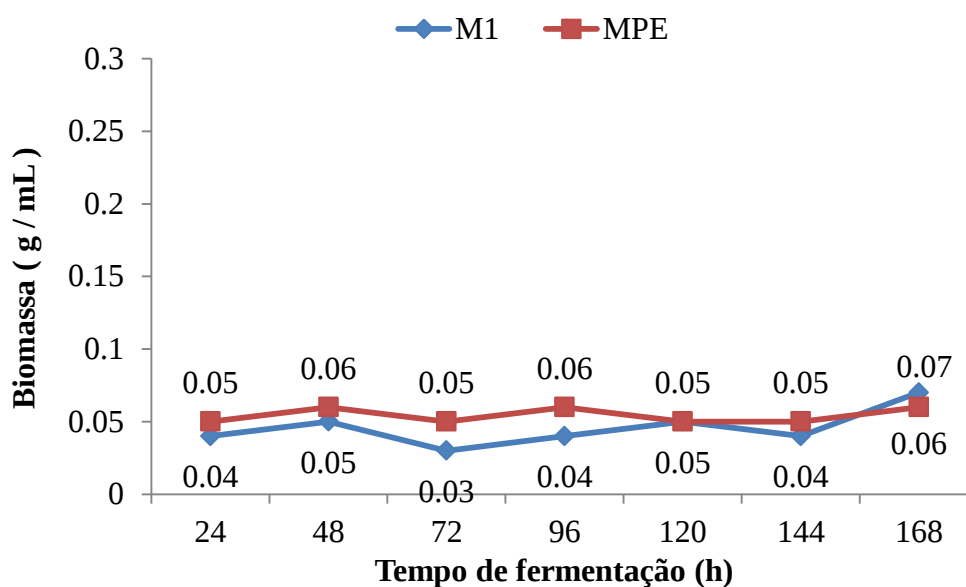


Tabela 31 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de *Streptomyces* sp. MPO3 nos meios M1 e MPE.

Tempo	M1			MPE		
	Biomassa	pH	T°C	Biomassa	pH	T°C
24	0,04	5,79	22,9	0,05	7,12	23,5
48	0,05	6,79	25,9	0,06	6,2	27,1
72	0,03	6,31	23	0,05	6,38	22,9
96	0,04	6,16	23,3	0,06	6,59	23,6
120	0,05	5,55	23,5	0,05	6,72	23,7
144	0,04	6,87	23,4	0,05	5,79	25,6
168	0,07	6,11	22,9	0,06	7,16	23,5

Figura 37 – Biomassa da fermentação de *Streptomyces* sp.MPO3 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.



O líquido fermentado de *Streptomyces* sp. MPO3 produzido durante as 168h de fermentação nos meios M1 e MPE foram ativos contra a levedura *Candida albicans*, com maior atividade do líquido de 24 h com halo de inibição de 15,3 mm, seguido de MPE com halo de inibição de 13,6 mm. Há produção de compostos antifúngicos ativos contra *Candida krusei* apenas no meio M1 em 72h de fermentação, com halo inibição de 10,6 mm. O pH no melhor período de produção do antifúngico no meio M1 foi de 5,7 e no meio MPE foi de 7,1 (Tabela 32) (Figura 38) .

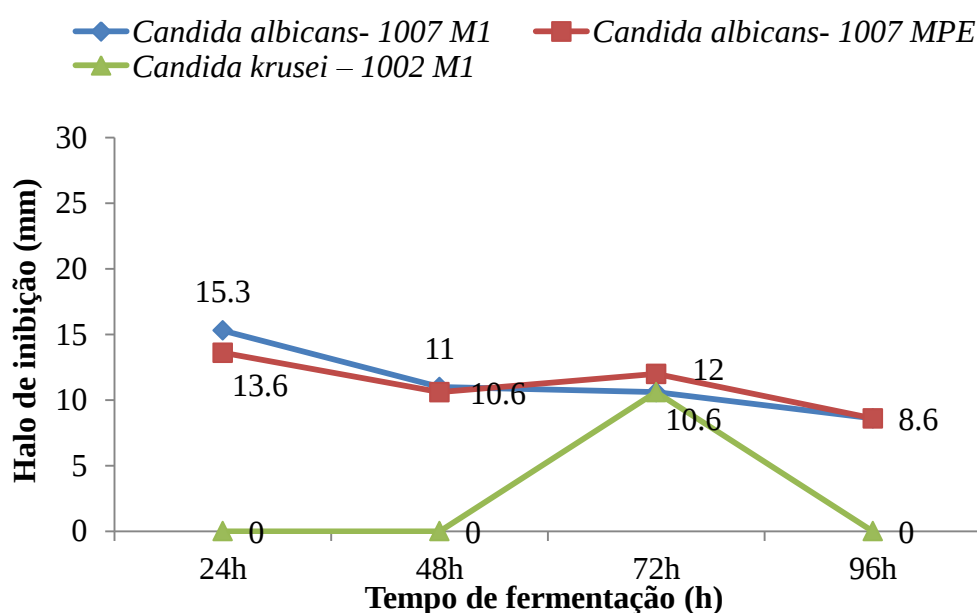
Tabela 32 - Halos de inibição (mm) de *Candida albicans* e *Candida krusei* frente ao líquido de *Streptomyces* sp. MPO3 fermentado nos meios M1 e MPE.

- sem atividade.

Atividade antimicrobiana do Líquido Fermentado de <i>Streptomyces</i> sp. MPO3			
Tempo	<i>Candida albicans</i> - 1007		<i>Candida krusei</i> – 1002
	Meio M1	Meio MPE	Meio M1
24h	15,3±0,58	13,6±0,58	-
48h	11±0,0	10,6±0,58	-
72h	10,6±0,58	12±0,0	10,6±0,58
96h	8,6±0,0	8,6±0,58	-

- sem atividade.

Figura 38 - Produção de metabólitos antifúngicos de *Streptomyces* sp. MPO3 em meio M1 e MPE durante 96h de fermentação.



Durante a fermentação de *Streptomyces* sp. MPO5 nos meios M1 e MPE houve pouco desenvolvimento da biomassa, sendo que o meio MPE foi o melhor meio para produção de biomassa, com maior produção em 120h seguido do meio M1 em 72h. Nestes períodos o pH do líquido fermentado foi de 8,3 e 8,0 nos meios MPE e M1, respectivamente (Tabela 33).

Tabela 33 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de *Streptomyces* sp. MPO5 nos meios M1 e MPE.

Tempo	Meio M1			Meio MPE		
	Biomassa	pH	T°C	Biomassa	pH	T°C
24	0,04	7,48	23,70	0,05	6,34	23,60
48	0,05	6,97	23,50	0,05	5,55	24,70
72	0,06	8,05	27,30	0,06	6,76	26,10
96	0,06	8,36	26,40	0,06	7,30	26,30
120	0,06	8,59	25,30	0,07	8,35	25,10
144	0,06	8,15	24,50	0,06	8,05	24,70
168	0,06	8,06	24,00	0,07	8,18	24,00

Streptomyces sp. MPO5 produz metabólitos antifúngicos apenas no meio MPE, entre 24h e 72h de fermentação, com maior produção do antifúngico em 48h, o qual apresentou halo de inibição de 15,3 mm frente à *Candida albicans*, como apresentado nas figuras 39 e 40 e tabela 34. Neste período houve uma diminuição do valor de pH do líquido para 5,5. Não foram produzidos metabólitos antifúngicos contra *Fusarium* sp. nos meios M1 e MPE. O melhor meio para produção de biomassa foi MPE (Figura 39).

Figura 39 – Biomassa da fermentação de *Streptomyces* sp.MPO5 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.

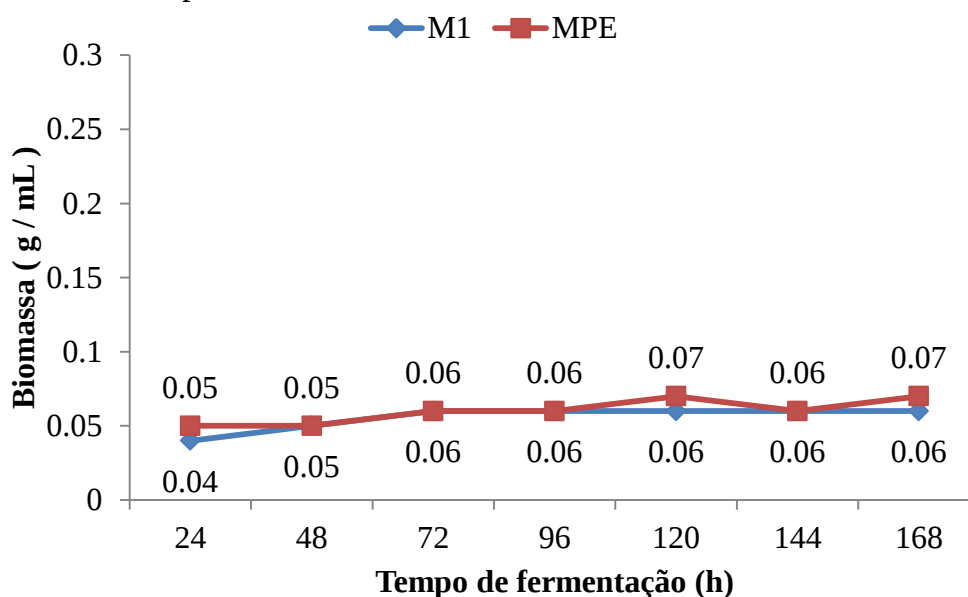
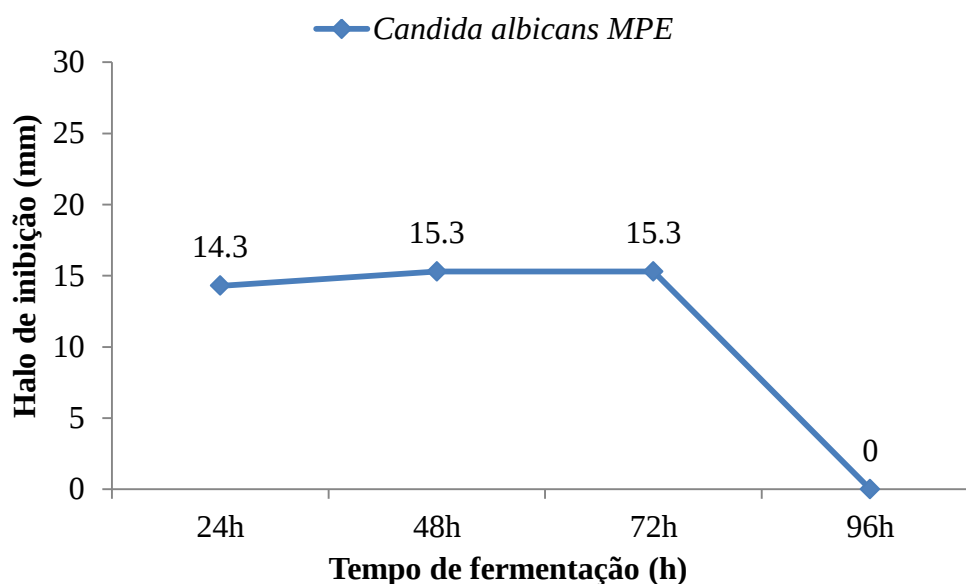


Tabela 34 - Halos de inibição (mm) de *Candida albicans* e *Fusarium* sp. frente ao líquido de *Streptomyces* sp. MPO5 fermentado nos meios M1 e MPE.

Atividade antimicrobiana do Líquido Fermentado de <i>Streptomyces</i> sp. MPO5	
Tempo	<i>Candida albicans</i>
	Meio MPE
24h	14,3±0,58
48h	15,3±0,58
72h	15,3±0,58
96h	-

Figura 40 - Produção de metabólitos antifúngicos de *Streptomyces* sp. MPO5 em meio M1 e MPE durante 96h de fermentação.

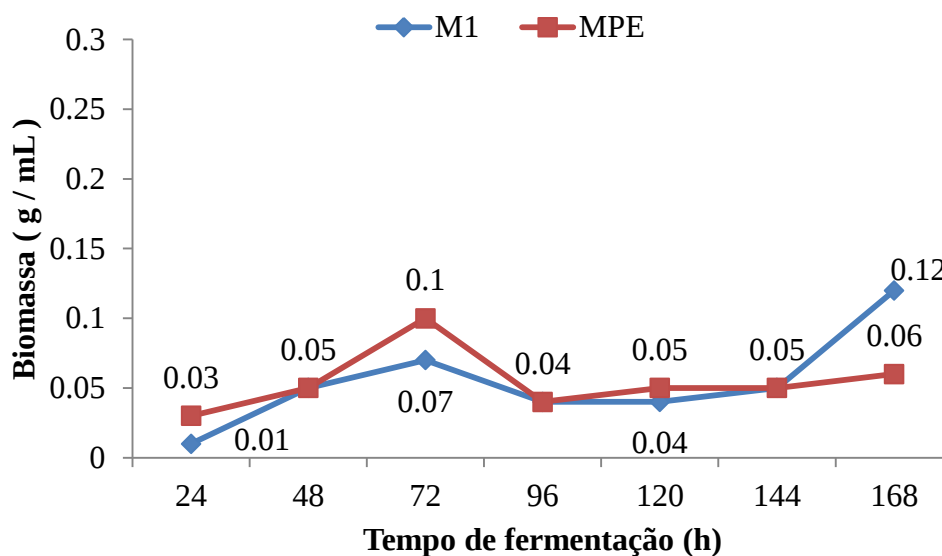


O pH da fermentação de *Streptomyces* sp. MPO6 variou entre 4,7 e 8,2 em meio M1 e 6,5 e 8,0 em meio MPE (Tabela 35). A maior produção de biomassa ocorreu em meio MPE entre 48h e 72h, modificando o pH do líquido de 6,5 para 7,8 (Figura 41).

Tabela 35 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de *Microbacterium xylanilyticum* MPO6 nos meios M1 e MPE.

Tempo	Meio M1			Meio MPE		
	Biomassa	pH	T°C	Biomassa	pH	T°C
24	0,01	4,70	25,01	0,03	7,18	25,0
48	0,05	7,53	20,30	0,05	6,54	20,0
72	0,07	7,91	26,08	0,1	7,8	26,7
96	0,04	8,13	22,40	0,04	7,03	22,8
120	0,04	7,74	22,20	0,05	7,75	22,2
144	0,05	8,08	27,40	0,05	7,89	27,4
168	0,12	8,20	25,20	0,06	8,03	26,4

Figura 41 – Biomassa da fermentação de *Microbacterium xylanilyticum* MPO6 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.



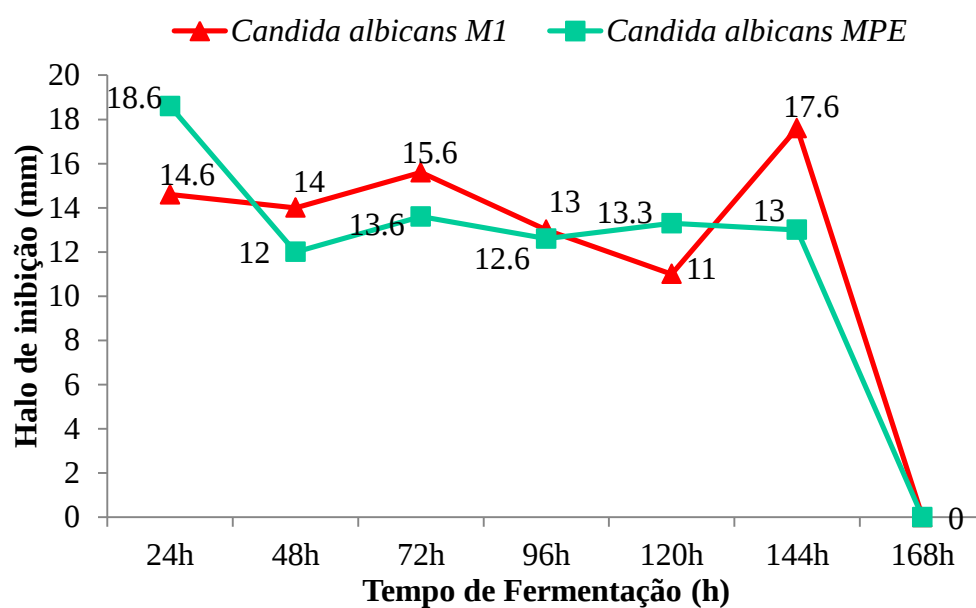
Streptomyces sp. MPO6 produziu metabólitos antifúngicos contra *Candida albicans* durante as 144h de fermentação, com maior produção em 24h no meio MPE, correspondendo ao halo de inibição de 18,6 mm, e em 144h de fermentação no meio M1, apresentando halos de inibição de 17,6mm (Figura 42). Nestes períodos de maior produção do antifúngico o pH do meio MPE era de 7,1 e 8,08 em M1 (Tabela 36).

Tabela 36 - Halos de inibição (mm) de *Candida albicans* frente ao líquido metabólico de *Streptomyces* sp. MPO6.

Tempo	<i>Candida albicans</i>	
	Meio M1	Meio MPE
24h	14,6±0,58	18,6±0,58
48h	14±0,0	12±0,0
72h	15,6±0,58	13,6±0,58
96h	13±0,0	12,6±0,58
120h	11±0,0	13,3±1,15
144h	17,6±0,58	13±0,0
168h	-	-

- sem atividade.

Figura 42 - Produção de metabólitos antifúngicos de *Streptomyces* sp. MPO6 em meio M1 e MPE durante 168h de fermentação.

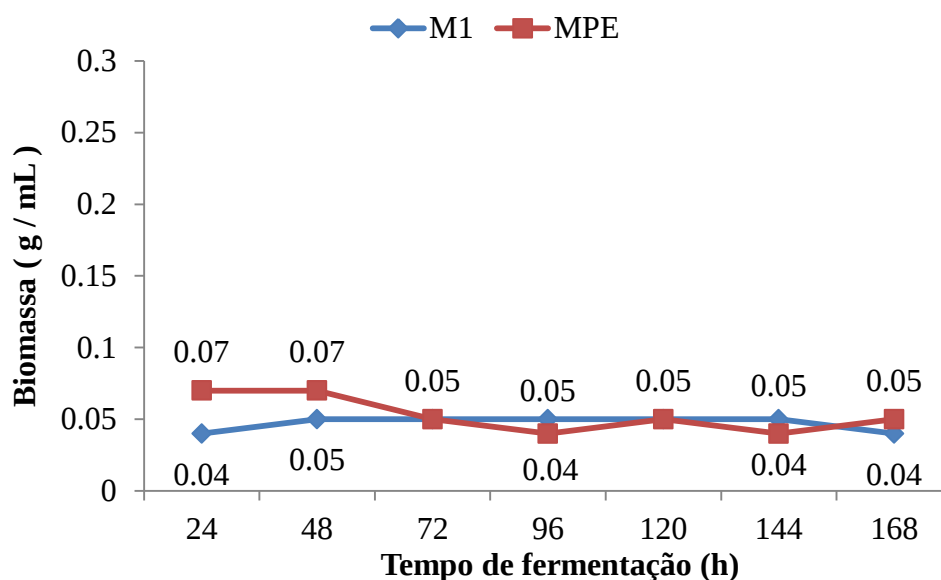


A linhagem *Streptomyces* sp. MPO7 produziu maior biomassa no meio MPE, com maior produção em 48h (Figura 43). Neste período o pH do líquido era de 6,6. O pH do líquido fermentado variou entre 7,2 e 7,9 em meio MPE e entre 7,2 e 8,6 em M1 (Tabela 37).

Tabela 37 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de *Streptomyces* sp. MPO7 nos meios M1 e MPE.

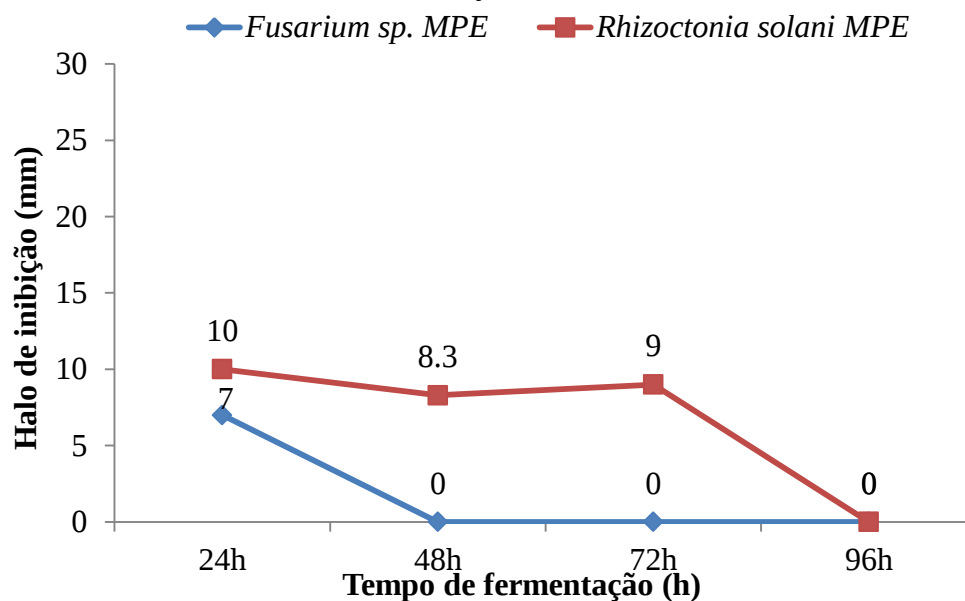
Tempo	Meio M1			Meio MPE		
	Biomassa	pH	T°C	Biomassa	pH	T°C
24	0,04	7,2	24,2	0,07	7,2	22,9
48	0,05	7,9	23,9	0,07	6,6	23,3
72	0,05	7,4	26,4	0,05	7,3	25,3
96	0,05	7,7	26,0	0,04	7,5	26,9
120	0,05	8,1	24,0	0,05	7,4	25,3
144	0,05	8,1	23,8	0,04	7,6	23,2
168	0,04	8,6	23,3	0,05	7,9	23,0

Figura 43 – Biomassa da fermentação de *Streptomyces* sp.MPO7 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.



Streptomyces sp. MPO7 produz metabólitos antifúngicos apenas no meio MPE até 48h de fermentação. A maior produção do composto ocorre em 24h, mostrando halo de inibição de 10,6 mm para *Rhizoctonia solani* e 7 mm para *Fusarium* sp. Não há produção de metabólitos antibacterianos em nenhum dos meios testados (Figura 44).

Figura 44 - Produção de metabólitos antifúngicos de *Streptomyces* sp. MPO7 em meio MPE durante 96h de fermentação.

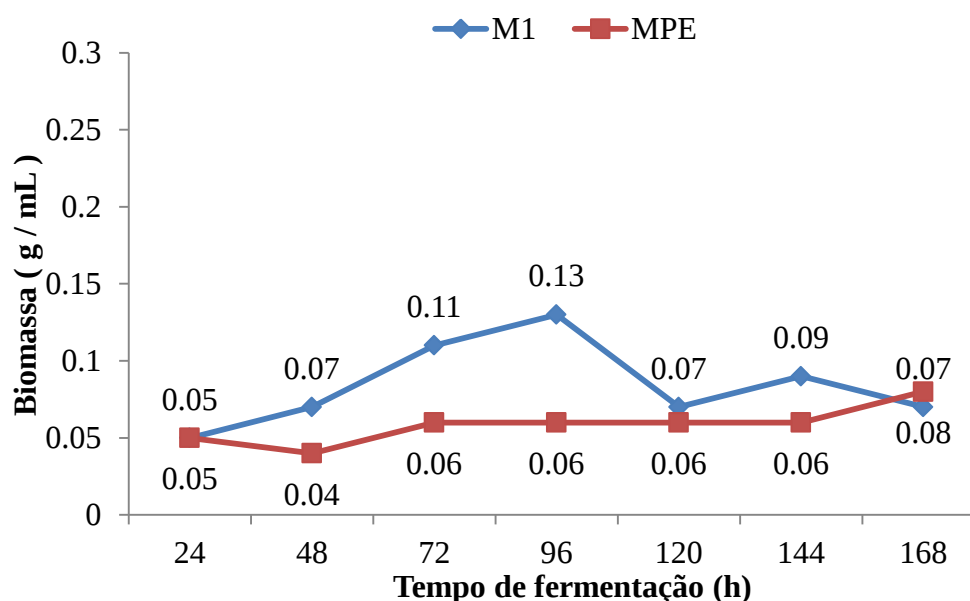


A linhagem *Streptomyces* sp. MPO8 produziu maior biomassa no meio M1 entre 72 e 96h de fermentação (Figura 45). Neste período o pH do líquido variou entre 7,8 e 8,3. Durante a fermentação o pH variou entre 7,5 e 8,4 no meio M1 e entre 7,0 e 8,0 no meio MPE (Tabela 38).

Tabela 38 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de *Streptomyces* sp. MPO8 nos meios M1 e MPE.

Tempo	Meio M1			Meio MPE		
	Biomassa	pH	T°C	Biomassa	pH	T°C
24	0,05	7,51	24,7	0,05	7,42	24,3
48	0,07	7,23	23,1	0,04	7,03	24,6
72	0,11	7,88	25,2	0,06	7,42	24,8
96	0,13	8,37	22,1	0,06	7,98	22,4
120	0,07	8,38	24,2	0,06	7,82	23,9
144	0,09	7,97	23,9	0,06	8,08	23,7
168	0,07	8,4	23,8	0,08	7,35	23,4

Figura 45 – Biomassa da fermentação de *Streptomyces* sp.MPO8 em meio M1 e MPE.



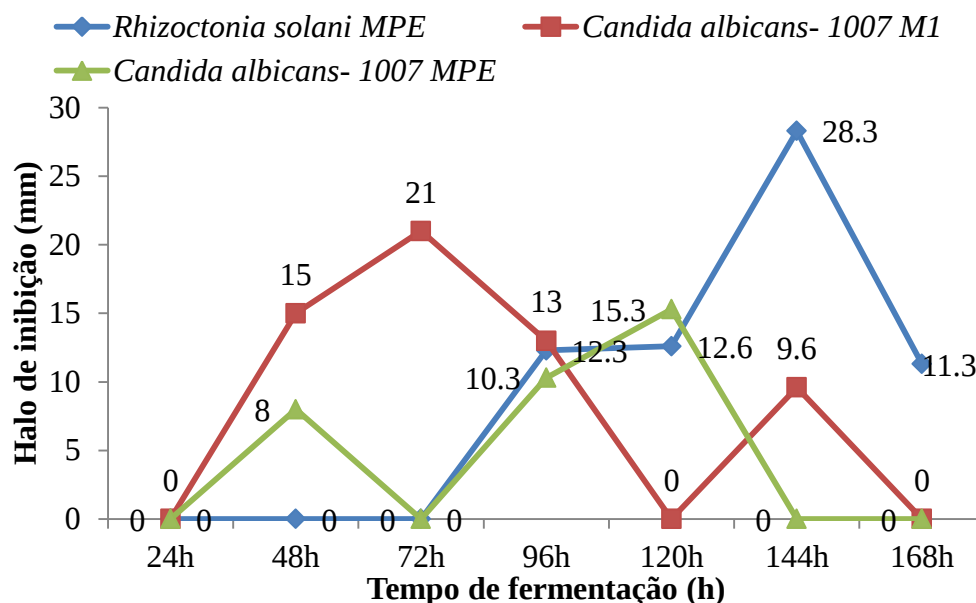
Streptomyces sp. MPO8 produz metabólitos antifúngicos entre 48h e 96h de fermentação nos meios M1 e MPE com ação sobre o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* e a levedura *Candida albicans*. A produção de antifúngico ativos contra *R. solani* ocorre apenas no meio MPE, com maior produção do antifúngico em 144h de fermentação, apresentando halo de inibição de crescimento de 28,3 mm (Figura 46). Em ambos os meios foi observado produção de antifúngico ativo contra *Canida albicans*, com maior produção em 72h de fermentação em meio M1, apresentando halo de inibição de 21 mm (Tabela 39).

Tabela 39 - Halos de inibição (mm) de *Rhizoctonia solani* e *Candida albicans* do líquido fermentado de *Streptomyces* sp. MPO8.

Tempo	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Candida albicans</i> - 1007	
	MPE	M1	MPE
24h	-	-	-
48h	-	15±0,0	8±0,0
72h	-	21±0,0	-
96h	12,3±0,58	13±0,0	10,3±0,58
120h	12,6±0,58	-	15,3±0,58
144h	28,3±0,58	9,6±0,58	-
168h	11,3±0,58	-	-

- sem atividade.

Figura 46 - Produção de metabólitos antifúngicos de *Streptomyces* sp. MPO8 em meio M1 e MPE durante 168h de fermentação.



A biossíntese de metabólitos secundários como antibióticos é uma habilidade inerente a determinados micro-organismos e sua expressão é regulada por fatores físico-químicos utilizados no processo de obtenção em meio sólido ou líquido, como, fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, presença de elementos-traço, condições de aeração, pH, temperatura de crescimento microbiano e tempo de cultivo (IWAI e OMURA, 1982; THADIKAMALA e REDDY, 2011).

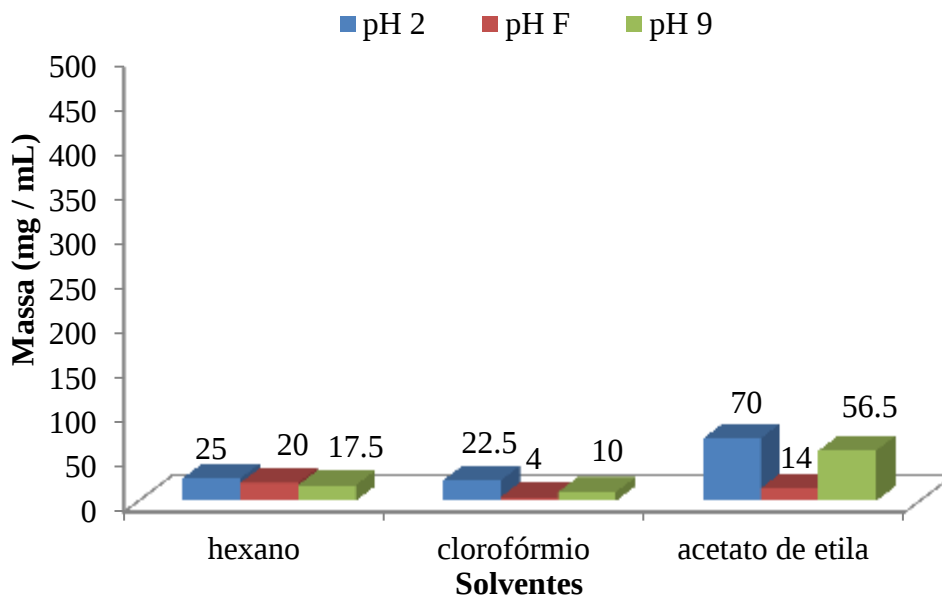
5.11 Obtenção do Extrato bruto

Foi realizada a extração dos metabólitos antimicrobianos dos extratos mais ativos, correspondendo à fermentação das linhagens *Streptomyces* sp. MPO2 em meio MPE, *Streptomyces* sp. MPO3 em meio M1, *Streptomyces* sp. MPO5 em meio MPE, *Microbacterium xylanilyticum* MPO6 em meio MPE e *Streptomyces* sp. MPO8 em meio MPE.

O maior rendimento de extrato bruto da fermentação de *Streptomyces* sp. MPO3 foi obtido com a extração em acetato de etila, com o líquido em pH ácido (pH 2), obtendo-se uma

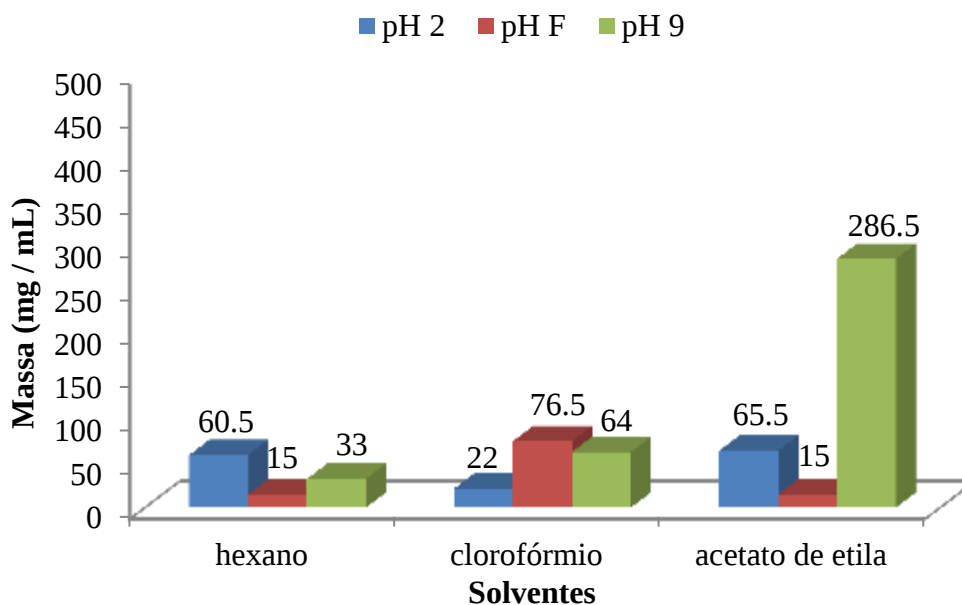
massa de 70 mg, com menor rendimento obtido da extração em clorofórmio, com o pH original da fermentação, obtendo-se a massa de 4 mg (Figura 47).

Figura 47 - Rendimento dos extratos brutos de *Streptomyces* sp. MPO3 obtido através de extração do líquido metabólico de M1 em pH 2, pH 5,79 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.



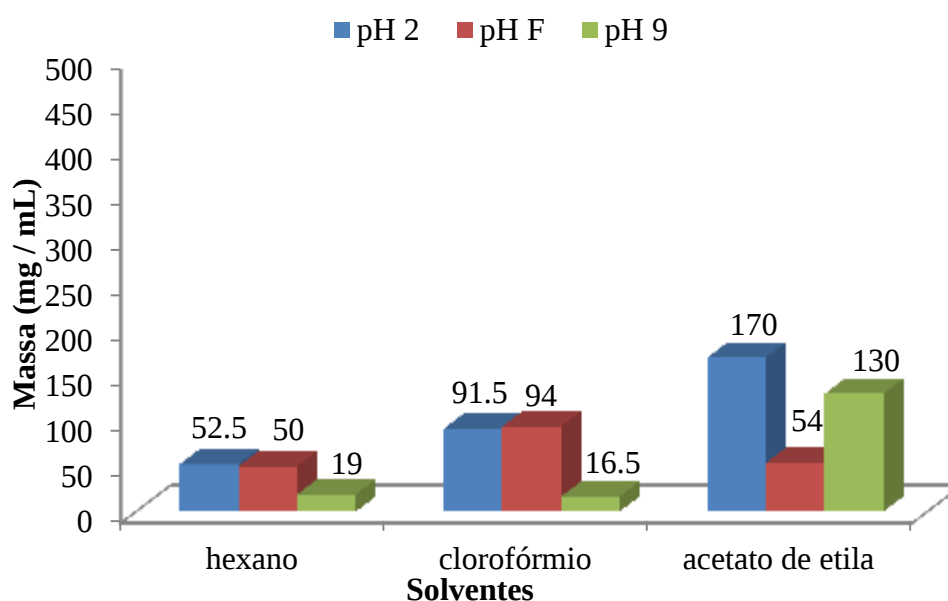
O maior rendimento do extrato bruto de *Streptomyces* sp. MPO2 foi obtido com a extração em acetato de etila, com o líquido em pH alcalino (pH 9), obtendo-se uma massa de 0,28 g/L, e o menor rendimento foi obtido com a extração em hexano e acetato de etila em pH original da fermentação, obtendo-se para cada um a massa de 15 mg (Figura 48).

Figura 48 - Rendimento dos extratos brutos de *Streptomyces* sp. MPO2 obtido através de extração do líquido metabólico de MPE em pH 2, pH 7,56 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.



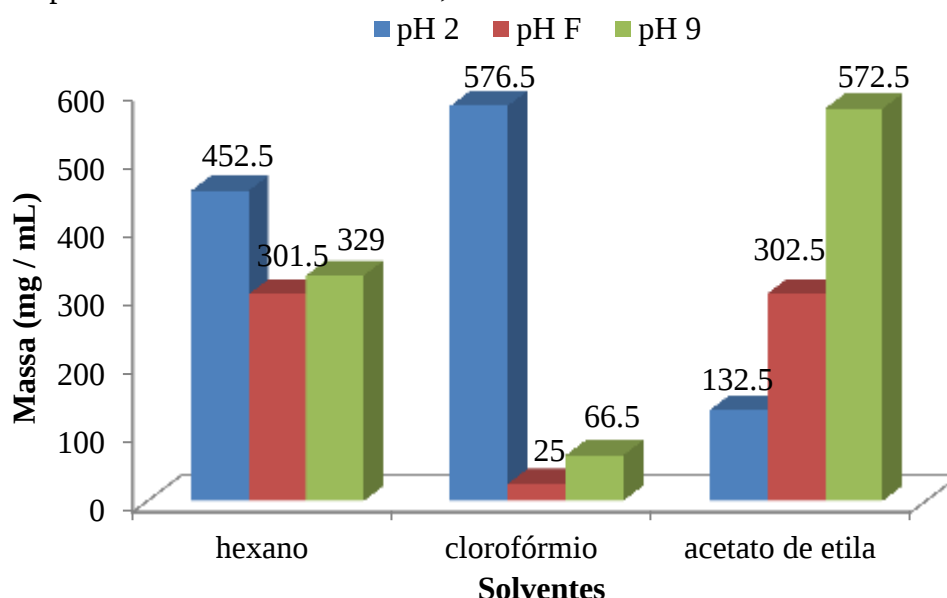
O maior rendimento do extrato bruto de *Streptomyces* sp. MPO5 foi obtido com a extração em acetato de etila, com o líquido em pH ácido (pH 2), obtendo-se uma massa de 170 mg, e o menor rendimento foi obtido com a extração em clorofórmio em pH alcalino (pH 9), obtendo-se para cada um a massa de 16,5 mg (Figura 49).

Figura 49 - Rendimento dos extratos brutos de *Streptomyces* sp. MPO5 obtido através de extração do líquido metabólico de MPE em pH 2, pH 5,55 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.



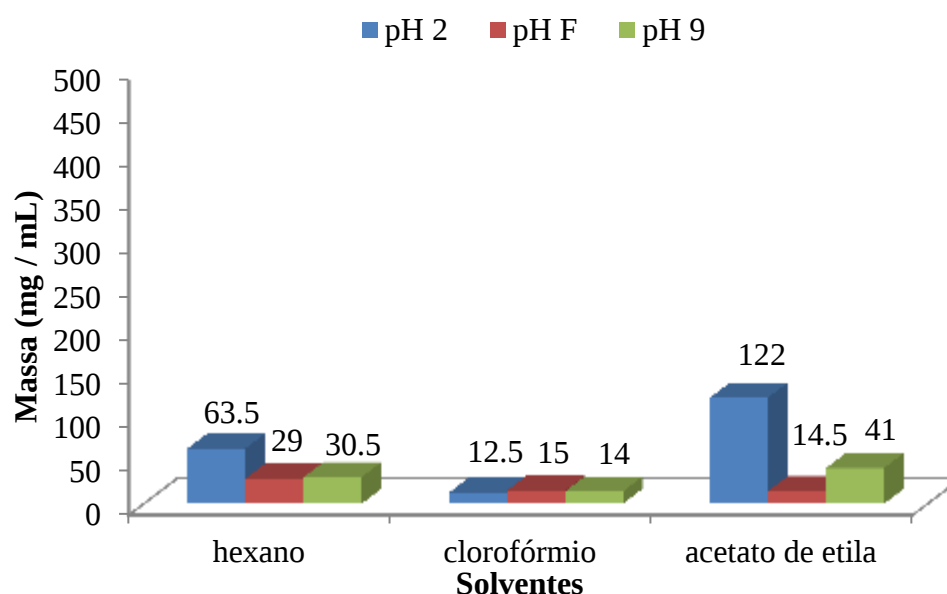
O maior rendimento do extrato bruto de *Microbacterium xylanilyticum* MPO6 foi obtido com a extração em clorofórmio e acetato de etila, com o líquido em pH ácido (pH 2) e alcalino (pH 9), respectivamente, obtendo-se uma massa de 576,5 mg e 572,5 mg. O menor rendimento foi obtido com a extração em clorofórmio no pH original da fermentação, obtendo-se a massa de 25 mg (Figura 50).

Figura 50 - Rendimento dos extratos brutos de *Microbacterium xylanilyticum* MPO6 obtido através de extração do líquido metabólico de MPE em pH 2, pH 7,18 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.



O maior rendimento do extrato bruto de *Streptomyces* sp. MPO8 foi obtido com a extração em acetato de etila, com o líquido em pH ácido (pH 2), obtendo-se uma massa de 122 mg. O menor rendimento foi obtido com a extração em clorofórmio com líquido em pH alcalino (pH 9) e acetato de etila com o líquido com pH original da fermentação original da fermentação, obtendo-se a massa de 14 mg e 14,5 mg, respectivamente (Figura 51).

Figura 51 - Rendimento dos extratos brutos de *Streptomyces* sp. MPO8 obtido através de extração do líquido metabólico de MPE em pH 2, pH 8,37 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.



5.12 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos

5.12.1 Ensaio de Difusão em Disco

Foi verificada a atividade antimicrobiana dos extratos na concentração de 10.000 µg / mL pelo método de difusão em disco para verificar em qual dos extratos estava presente o metabólito antimicrobiano. Os solventes hexano e acetato de etila extraíram os metabólitos antimicrobianos (Tabela 40, 41 e 42).

Tabela 40 - Atividade antimicrobiana dos extratos brutos na concentração de 10 mg/mL contra *Candida albicans*.

Linhagem	Halo de inibição (mm) de <i>Candida albicans</i>								
	pH2			pHF			pH9		
	H	C	A	H	C	A	H	C	A
<i>Streptomyces</i> sp. MPO2	-	-	11	-	-	13,0	-	-	11,0
<i>Streptomyces</i> sp. MPO3	21	-	-	18	-	-	17	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. MPO5	13,0	-	-	11	-	-	11	-	-
<i>M. xylanilyticum</i> MPO6	-	-	11	-	-	12	-	-	10
<i>Streptomyces</i> sp. MPO8	-	-	-	-	-	14,0	-	-	17,0

- sem atividade; H. hexano; C. clorofórmio; A. acetato de etila.

Tabela 41 - Atividade antimicrobiana dos extratos brutos na concentração de 10 mg/mL contra *Candida krusei*.

Linhagem	Halo de inibição (mm) de <i>Candida krusei</i>								
	pH2			pHF			pH9		
	H	C	A	H	C	A	H	C	A
<i>Streptomyces</i> sp. MPO2	-	-	10,0	-	-	11,0	-	-	10,0
<i>Streptomyces</i> sp. MPO3	12,0	-	-	11,0	-	-	10,0	-	-

- sem atividade; H. hexano; C. clorofórmio; A. acetato de etila.

Tabela 42 - Atividade antimicrobiana dos extratos brutos na concentração de 10 mg/mL contra *Rhizoctonia solani*.

Linhagem	Halo de inibição (mm) de <i>Candida krusei</i>								
	pH2			pHF			pH9		
	H	C	A	H	C	A	H	C	A
<i>Streptomyces</i> sp. MPO8	-	-	-	-	-	11,0	-	-	14,0

- sem atividade; H. hexano; C. clorofórmio; A. acetato de etila.

5.12.2 Concentração mínima inibitória – CMI

O Extrato de hexano de *Streptomyces* sp. MPO3 (EHS-3) apresentou maior atividade contra *Candida albicans* ativo na concentração de 78,1 µg / mL. O Extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO2 (EAS-2) foi ativo a 625 µg / mL, o Extrato de hexano de *Streptomyces* sp. MPO5 (EHS-5) e o Extrato de acetato de etila de *Microbacterium xylanititicum* MPO6 (EAMX-6) em 1.250 µg / mL e o Extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO8 (EAS-8) em 2.500 µg / mL (Tabela 43).

Tabela 43 - Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos contra *Candida albicans*.

Concentrações teste (µg / mL)										
Extrato	10.000	5.000	2.500	1.250	625	312,5	156	78,1	39,5	
EAS-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
EHS-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
EHS-5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
EAMX-6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
EAS-8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	

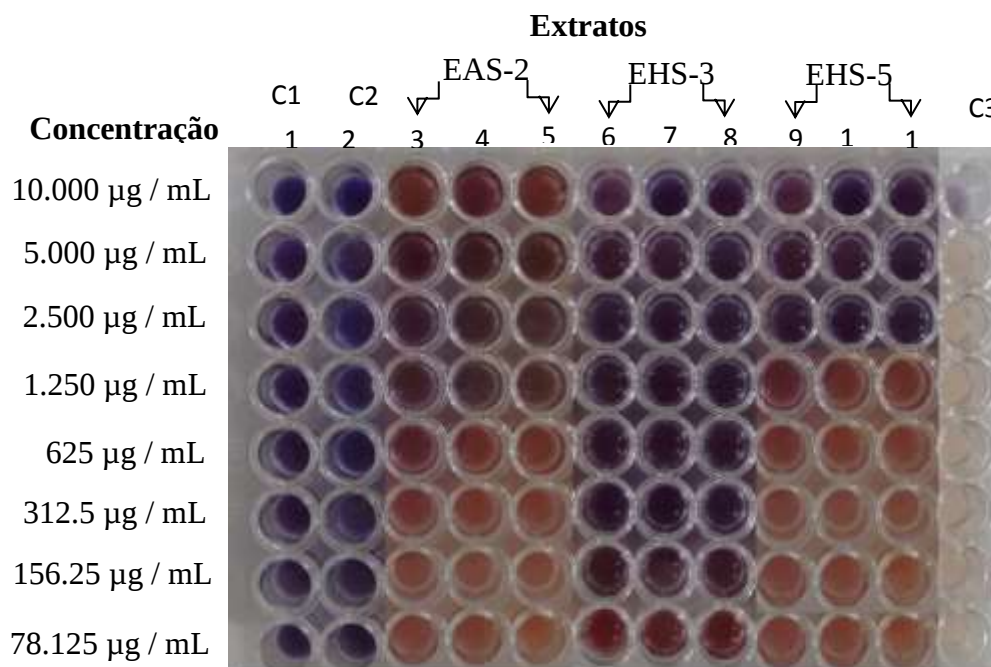
EAS-2 – Extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO2, meio MPE pH F; **EHS-3** – Extrato de hexano de *Streptomyces* sp. MPO3, meio M1 pH F; **EHS-5** - Extrato de hexano de *Streptomyces* sp. MPO5, meio MPE pH 2; **EAMX-6** - Extrato de acetato de etila de *Microbacterium xylanititicum* MPO6, meio MPE pH F; **EAS-8** 2 – Extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO8, meio MPE pH F; + ativo; - sem atividade.

Após revelação biológica da ação antimicrobiana dos extratos ativos na CMI para *Candida albicans* foi observado que maior atividade para o Extrato de hexano de *Streptomyces* sp. MPO3 (EHS-3), com ação fungicida a 78,1 µg / mL. O Extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO2 (EAS-2) foi o segundo extrato mais ativo, com ação fungicida a 1.250 µg / mL e fungistática a 625 µg / mL (Figura 52).

O Extrato de hexano de *Streptomyces* sp. MPO5 (EHS-5) e Extrato de acetato de etila de *Microbacterium xylanititicum* MPO6 (EAMX-6), apresentaram ação fungicida a 2.500 µg / mL e fungistática a 1.250 µg / mL.

O Extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO8 (EAS-8) foi o menos ativo, com ação fungicida a 5.000 µg / mL e ação fungistática a 2.500 µg / mL.

Figura 52 - Placa de ensaio da CMI dos Extratos orgânicos de MPO3 contra *Candida albicans*. C2 (Controle de esterilidade do meio de cultura), C1 (Nistatina 64 µg / mL), C3 (Controle de viabilidade do inóculo).



O Extrato de hexano de *Streptomyces* sp. MPO3 (EHS-3) foi o mais ativo contra para *Candida krusei*, com ação fungicida a 312,5 µg / mL e fungistática a 156 µg / mL. O Extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO2 (EAS-2) teve ação fungicida a 5.000 µg / mL e ação fungistática a 2.500 µg / mL (Tabela 44).

Tabela 44 - Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos contra *Candida krusei*.

Extrato	Concentrações teste (µg / mL)								
	10.000	5.000	2.500	1.250	625	312,5	156	78,1	39,5
EAS-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EHS-3	+	+	+	+	+	+	+	-	-

EAS-2 – Extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO2, meio MPE pH F; **EHS-3** – Extrato de hexano de *Streptomyces* sp. MPO3, meio M1 pH F; + ativo; - sem atividade.

O Extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO8, meio MPE pH F foi o mais ativo contra para *Rhizoctonia solani*, sendo que a CMI foi de 1.250 µg / mL com ação fungicida a 2.500 µg / mL (Tabela 45).

Tabela 45 - Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de *Streptomyces* sp. MPO8 contra *Rhizoctonia solani*.

Extrato	Concentrações teste (µg / mL)								
	10.000	5.000	2.500	1.250	625	312,5	156	78,1	39,5
EAS-8	+	+	+	+	-	-	-	-	-

EAS-8 2 – Extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO8, meio MPE pH F; + ativo; - sem atividade.

5.13 Rendimento do extrato bruto X Atividade do extrato

A linhagem *Streptomyces* sp. MPO3 foi a mais ativa contra *Candida albicans* e *Candida krusei*. O extrato de hexano (pH 2), foi mais ativo, apresentando ação fungicida a 78,1 µg / mL para *Candida albicans* e a 312,5 µg / mL para *Candida krusei*. Entretanto, este extrato apresentou baixo rendimento na extração com massa de 20 mg, em relação ao extrato de acetato (pH 2), que apresentou maior rendimento correspondendo a uma massa de 70 mg.

A linhagem *Streptomyces* sp. MPO2 foi a segunda mais ativa contra *Candida albicans* e *Candida krusei*. O extrato de acetato de etila (pH 7,56) foi o mais ativo. Este extrato apresentou menor rendimento durante a extração, correspondendo a uma massa de 15 mg, enquanto que o extrato de acetato de etila (pH 9) teve maior rendimento, correspondendo a uma massa de 286,5 mg.

Para a linhagem *Streptomyces* sp. MPO5 o extrato de hexano obtido do líquido metabólico com pH ácido (pH 2) foi o mais ativo, com ação fungicida a 2.500 µg / mL. O rendimento deste extrato foi baixo, obtendo-se uma massa de 52,5 mg, em relação ao extrato de acetato de etila (pH 2) com maior rendimento, correspondendo a massa de 170 mg.

O extrato de acetato de etila (pH F) da linhagem *Microbacterium xylanyliticum* MPO6 foi ativo contra *Candida albicans*, com ação fungicida também a 2.500 µg / mL. Entretanto, este extrato teve baixo rendimento com massa de 302,5 mg, em relação ao extrato de clorofórmio (pH 2) com maior rendimento, correspondendo a uma massa de 576,5 mg.

A linhagem *Streptomyces* sp. MPO8 foi a menos ativa contra *Candida albicans*, sendo que o extrato de hexano (pH 9) teve ação fungicida a 5.000 µg / mL. Este extrato teve baixo rendimento com massa de 41 mg, em relação ao extrato de acetato de etila (pH 2) que teve maior rendimento, com massa de 122 mg.

5.14 Prospecção química do extrato bruto

O Extrato de hexano de *Streptomyces* sp. MPO3 (EHS-3) foi o mais ativo e a cromatografia em camada delgada revelou a presença de metabólitos secundários pertencentes à classe das xantinas, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides, derivados antracênicos, e cumarinas.

As actinobactérias produzem diversos metabólitos secundários durante a fermentação, como pigmentos, enzimas extracelulares e compostos terpenóides aromáticos (ENSIGN, 1978). Estudos realizados por (LIMA, SILVA e ARAÚJO, 2013) identificaram a presença de alcaloides, açúcares redutores, compostos fenólicos e triterpenos e esteroides no extrato bruto acetoetílico de *Streptomyces hygroscopicus* isolado da rizosfera de *Paullinia cupana* Kuth.

Em estudo realizado por Thomas *et al.* (2011) para obtenção de metabólitos secundários da actinobactérias denominada B-2, utilizando a mesma metodologia do presente trabalho, através de sucessivas extrações com solventes orgânicos, identificaram a presença de flavonoides e esteróis no extrato bruto de acetato de etila, e apenas esteróis no extrato bruto de clorofórmio e Éter de petróleo.

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Foram isoladas 11 linhagens de actinobactérias do solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga), identificadas através de micromorfologia e identificação molecular, sendo 7 *Streptomyces* sp. e 1 *Microbacterium xylanilyticum*.

Das 11 actinobactérias isoladas, 7(63,6%) foram ativas contra pelo menos um dos patógenos testados, com espectro de ação variando entre bactérias Gram positivas, Gram negativas, leveduras e fungos filamentosos.

Houve produção de metabólitos antimicrobianos nos meios M1 e MPE, sendo que a linhagem *Streptomyces* sp. MPO3 foi a mais ativa, produzindo antifúngico em meio M1 em 24 h de fermentação foi mais ativa contra *Candida albicans* e *Candida krusei*.

O extrato bruto de hexano (EHS-3) foi o mais ativo apresentando ação fungicida contra *Candida albicans* em 78,1 µg / mL e *Candida krusei* 312,5 µg / mL (EAS-2).

O extrato bruto de hexano (EHS-3) da fermentação em meio M1 da linhagem *Streptomyces* sp. MPO3, apesar de ser o extrato mais ativo, apresentou baixo rendimento no processo de extração, correspondendo a 0,4 mg / mL.

A caracterização química preliminar do extrato de hexano de *Streptomyces* sp. MPO3 (EHS-3) através de cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a presença de metabólitos secundários pertencentes à classe das xantinas, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides, derivados antracênicos, e cumarinas.

Streptomyces sp. MPO3 isolado de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga) além de produzir metabólito antifúngico produz diversas enzimas de interesse biotecnológico como lipase, amilase, pectinase, hemolisina e L-glutaminase, com alto índice enzimático na produção de caseinase.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABRAMIĆ, M. et al. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 6, p. 522-529, 1999. ISSN 0141-0229.
- ADEGBOYE, M. F. et al. Analysis of *Streptomyces* spp. Native to Mahikeng Soils in South Africa. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 1001-1010, Sep 2012. ISSN 0973-7510.
- AGATE, A.; BHAT, J.; BILIMORIA, M. **Pectin trans-eliminase activity in *Streptomyces viridochromogenes***: CURRENT SCIENCE ASSN CV RAMAN AVENUE, PO BOX 8005, BANGALORE 560 080, INDIA. 31: 462-& p. 1962.
- AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A.; LUBKOWSKI, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 40, n. 19, p. 5655-64, May 15 2001. ISSN 0006-2960
- ALBERTON, L. R. et al. Avaliação do potencial de uso do extrato bruto da fermentação por *Streptomyces Viridosporus* T7 A em medicina veterinária. **Arq. ciênc. vet. zool. UNIPAR**, v. 9, n. 1, p. 41-47, 2006. ISSN 1415-8167.
- ALI, U. et al. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. **Eur J Pharmacol**, v. 771, p. 199-210, Dec 15 2015. ISSN 0014-2999.
- ALTAMIRANO, M. M. et al. Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 617-22, Feb 10 2000. ISSN 0028-0836.
- ALVES, C. Q. et al. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, v. 12, p. 1-8, 2007.
- AMENA, S. et al. Production, purification and characterization of l-asparaginase from *streptomyces gulbargensis*. **Braz J Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 173-8, Jan 2010. ISSN 1517-8382.
- ANTUNES, T. C. et al. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013. ISSN 1980-4849.
- ARASU, M. V. et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2009. ISSN 1156-5233.

ARAUJO, J. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. **Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA**, p. 351-367, 1998.

AÇIKEL, Ü.; ERŞAN, M.; AÇIKEL, Y. S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 31-39, 2010. ISSN 0960-3085.

BALAGURUNATHAN, R.; RADHAKRISHNAN, M.; SOMASUNDARAM, S. L-Glutaminase producing actinomycetes from marine sediments–selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. **Aust J Basic Appl Sci**, v. 4, n. 5, p. 698-705, 2010a.

_____. L-Glutaminase producing actinomycetes from marine sediments–selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 5, p. 698-705, 2010b. ISSN 1991-8178.

BARROSO, G. Sistemática de angiospermas do Brasil, vol 2 Imprensa Universitária UFRJ. **Rio de Janeiro**, 1991.

BASILIO, A. et al. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. **J Appl Microbiol**, v. 95, n. 4, p. 814-23, 2003. ISSN 1364-5072.

BATISTA, W. B. et al. Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de diferentes cultivares. **Unimontes Científica**, v. 12, n. 1/2, p. pág 60-68, 2011. ISSN 2236-5257.

BAUER, A. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966. ISSN 0002-9173.

BEG, Q. et al. **Bleach-boosting of eucalyptus kraft pulp using combination of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3**. Res Bull Panjab Univ Sci 51: 71–78. 2001

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 58, n. 1, p. 1-26, Jan 2005. ISSN 0021-8820.

BLACKWOOD, C. B.; OAKS, A.; BUYER, J. S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 10, p. 6193-8, Oct 2005. ISSN 0099-2240.

CANOVA, S. P. **Diversidade e bioprospecção de actinobactérias isoladas de manguezais**. 2009. Universidade de São Paulo

CARR, J. Tea, coffee and cocoa. **Microbiology of fermented foods**, v. 2, p. 133-154, 1985.

CHATER, K. F. et al. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 34, n. 2, p. 171-98, Mar 2010. ISSN 0168-6445.

CHO, S. S. et al. A neutral lipase applicable in biodiesel production from a newly isolated *Streptomyces* sp. CS326. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 35, n. 1-2, p. 227-34, Jan 2012. ISSN 1615-7591.

CLAVELL, L. A. et al. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 315, n. 11, p. 657-63, Sep 11 1986. ISSN 0028-4793.

COLLA, L. M. et al. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 21, p. 8308-14, Nov 2010. ISSN 0960-8524.

CORREA, M.; PENNA, L. D. A. Dicionario das plantas uteis do Brasil e das exoticas cultivadas: volume 5. MR. **Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal 687p.-illus.. Por Icones. Geog**, v. 4, 1974.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: Allen Press x, 396p. Illus., keys.. General (KR, 198000048), 1978.

DASTAGER, S. G. et al. Proteolytic activity from an alkali-thermotolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. **Curr Microbiol**, v. 57, n. 6, p. 638-42, Dec 2008. ISSN 0343-8651.

DE MANGUEZAIS, M. D. S. E. **LÍLIA MACEDO FIROOZMAND**. 2008. Universidade de São Paulo

DE MELO, C. T. et al. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 3, p. 451-4, Mar 2006. ISSN 0918-6158.

DERST, C. et al. States and functions of tyrosine residues in *Escherichia coli* asparaginase II. **Eur J Biochem**, v. 224, n. 2, p. 533-40, Sep 1 1994. ISSN 0014-2956 .

DHEEMAN, D. S.; FRIAS, J. M.; HENEHAN, G. T. Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 37, n. 1, p. 1-17, Jan 2010. ISSN 1367-5435.

DUARTE, M. W. Identificação de actinomicetos isolados de solo impactado com resíduos petroquímicos e seleção de potenciais degradadores de misturas de diesel e biodiesel. 2012.

EL-NAGGAR NEL, A. et al. Optimization of Culture Conditions for Production of the Anti-Leukemic Glutaminase Free L-Asparaginase by Newly Isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 Using Response Surface Methodology. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 627031, 2015.

ENSIGN, J. C. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. **Annu Rev Microbiol**, v. 32, p. 185-219, 1978. ISSN 0066-4227 .

FGUIRA, L. F.-B. et al. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 341-347, 2005. ISSN 0923-2508.

FIERER, N. et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 7, p. 4117-20, Jul 2005. ISSN 0099-2240.

FLARDH, K.; BUTTNER, M. J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 36-49, Jan 2009. ISSN 1740-1526.

GANDOLFI, R. et al. Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities. **J Appl Microbiol**, v. 89, n. 5, p. 870-5, Nov 2000. ISSN 1364-5072.

GEBREYOHANNES, G. et al. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 3, n. 6, p. 426-35, Jun 2013. ISSN 2221-1691.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H.-P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 119-142, 2010. ISSN 0003-6072.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. **Lett Appl Microbiol**, v. 24, n. 1, p. 23-6, Jan 1997. ISSN 0266-8254.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003. ISSN 1359-5113.

GUPTA, R. S. Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 2, p. 171-82, Aug 2011. ISSN 0003-6072.

GURUNG, N. et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 329121, 2013.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis**. Springer Science & Business Media, 1998. ISBN 0412572702.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006. ISSN 0141-0229.

HECK, M. G. Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. linhagem 2S. 2007.

HOLT, J. et al. Gram-positive cocci. **Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins**, p. 544-51, 1994.

HONDA, K. et al. Purification and characterization of a novel esterase promising for the production of useful compounds from *Microbacterium* sp. 7-1W. **FEMS microbiology letters**, v. 206, n. 2, p. 221-227, 2002. ISSN 0378-1097.

HOONDAL, G. et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 409-418, 2002. ISSN 0175-7598.

HOPWOOD, D. A. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. **Microbiology**, v. 145 (Pt 9), p. 2183-202, Sep 1999. ISSN 1350-0872.

HOWARD, J. B.; CARPENTER, F. H. L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Substrate specificity and enzymatic properties. **J Biol Chem**, v. 247, n. 4, p. 1020-30, Feb 25 1972. ISSN 0021-9258.

ICHIKAWA, T. et al. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 16, n. 3, p. 218-24, 1971. ISSN 0015-5632.

IMAMURA, S.; KITAURA, S. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **Journal of Biochemistry**, v. 127, n. 3, p. 419-425, 2000. ISSN 0021-924X.

IWAI, Y.; OMURA, S. Culture conditions for screening of new antibiotics. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 35, n. 2, p. 123-41, Feb 1982. ISSN 0021-8820.

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998. ISSN 0167-7799.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 9, p. 396-403, Sep 1998. ISSN 0167-7799 .

JAWETZ, E.; LEVINSON, W. Microbiologia médica e imunologia. **Porto Alegre**, 2005.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005. ISSN 1359-5113.

JEFFREY, L. et al. Isolation and screening of actinomycetes from Malaysian soil for their enzymatic and antimicrobial activities. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 35, n. 1, p. 159, 2007. ISSN 1394-9829.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 5, p. 457-70, Sep-Oct 2008. ISSN 0734-9750.

KADEMI, A. et al. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 173-179, 2000. ISSN 0175-7598.

KAMBOUROVA, M. et al. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5, p. 307-313, 2003. ISSN 1381-1177.

KARPUSHOVA, A. et al. Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 67, n. 1, p. 59-69, Apr 2005. ISSN 0175-7598.

KASHYAP, D. et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 277-282, 2000. ISSN 0959-3993.

KASHYAP, P. et al. Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 307-312, 2002. ISSN 1359-5113.

KENNEDY, A. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 74, n. 1, p. 65-76, 1999. ISSN 0167-8809.

KIL, J. O.; KIM, G. N.; PARK, I. Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, n. 4, p. 749-50, Apr 1995. ISSN 0916-8451.

KIRCHHEIMER, F.; WHITTAKER, C. K. Asparaginase of Mycobacteria. **Am Rev Tuberc**, v. 70, n. 5, p. 920-1, Nov 1954. ISSN 0096-0381.

KOIBUCHI, K. et al. **Glutaminase, its gene and a method of producing it**: Google Patents 2004.

KORN-WENDISCH, F. et al. The family Streptomycetaceae. **The Prokaryotes**, n. Ed. 2, p. 921-995, 1992. ISSN 0387972587.

KUPIECKI, F. P.; COON, M. J. The enzymatic synthesis of beta-aminoisobutyrate, a product of valine metabolism, and of beta-alanine, a product of beta-hydroxypropionate metabolism. **J Biol Chem**, v. 229, n. 2, p. 743-54, Dec 1957. ISSN 0021-9258.

LANE, D. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, p. 125-175, 1991.

LI, H.; ZHANG, X. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. **Protein expression and purification**, v. 42, n. 1, p. 153-159, 2005. ISSN 1046-5928.

LIMA, S. M. D. A.; SILVA, T. G. D. O.; ARAÚJO, J. M. D. C. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTMS-9H isolada da rizosfera de *Paulinia cupana* Kunth. 2013.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Artmed, 2004. ISBN 8536323302.

MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, p. 240-253, 2011. ISSN 1945-0494.

MALADKAR, N. K.; SINGH, V. K.; NAIK, S. R. Fermentative production and isolation of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, EC-113. **Hindustan Antibiot Bull**, v. 35, n. 1-2, p. 77-86, Feb-May 1993. ISSN 0018-1935.

MANDER, P. et al. An organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. CS133 for enzymatic transesterification of vegetable oils in organic media. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 635-642, 2012. ISSN 1359-5113.

MARIANO, R. et al. Isolamento de bactérias para testes de antagonismo. **Manual de práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 115-119, 2000.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MERCADO, L.; ARENAS, G. [*Escherichia coli* L-asparaginase induces phosphorylation of endogenous polypeptides in human immune cells]. **Sangre (Barc)**, v. 44, n. 6, p. 438-42, Dec 1999. ISSN 0036-4355.

MESAS, J. M.; GIL, J. A.; MARTIN, J. F. Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. **J Gen Microbiol**, v. 136, n. 3, p. 515-9, Mar 1990. ISSN 0022-1287.

METZ, H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations. **Naturwissenschaften**, v. 48, p. 569-570, 1961.

MINOTTO, E. Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. 2014.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892, 2005. ISSN 0100-4042.

MOREIRA, F. D. S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Ufla, 2006.

MOSTAFA, S. A.; SALAMA, M. S. L-asparaginase-producing *Streptomyces* from the soil of Kuwait. **Zentralbl Bakteriol Naturwiss**, v. 134, n. 4, p. 325-34, 1979. ISSN 0323-6056.

MUKHERJEE, G.; SEN, S. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Streptomyces venezuelae* P10. **Current microbiology**, v. 53, n. 4, p. 265-269, 2006. ISSN 0343-8651.

MUKHERJEE, J.; MAJUMDAR, S.; SCHEPER, T. Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 180-184, 2000. ISSN 0175-7598.

MULEY, R. G. et al. Influence of alkali-treated cornsteep liquor containing medium on protein A production by *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 43, n. 1, p. 31-4, 1998. ISSN 0015-5632.

NAIDU, G.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes—a review. **Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 5, p. 355-361, 1998. ISSN 0178-515X.

NARAYANA, K. J.; KUMAR, K. G.; VIJAYALAKSHMI, M. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. **Indian J Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 331-6, Sep 2008. ISSN 0046-8991.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 61, n. 3, p. 208-21, Mar 2007. ISSN 1040-8428.

NGUYEN, Q. D. et al. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 345-352, 2002. ISSN 0141-0229.

NONOMURA, H.; OHARA, Y. The distribution of actinomycetes in soil. VI. A selective plate culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains Part I. **J. Ferm. Technol**, v. 47, p. 463-469, 1969.

OLIVEIRA, B. F. R. D. Análise das atividades antimicrobiana e citotóxica de actinobactérias isoladas de diversos habitats. 2015.

OVERBYE, K. M.; BARRETT, J. F. Antibiotics: where did we go wrong? **Drug Discov Today**, v. 10, n. 1, p. 45-52, Jan 1 2005. ISSN 1359-6446.

OZA, V. P. et al. Cloning, expression and characterization of l-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production. **3 Biotech**, v. 1, n. 1, p. 21-26, Jul 2011. ISSN 2190-5738.

PALLEM, C.; MANIPATI, S.; SOMALANKA, S. R. Process optimization of L-glutaminase production by *Trichoderma koningii* under solid state fermentation (SSF). **Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol**, v. 1, p. 1168-1174, 2010.

PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 29 (Pt 2), p. 119-31, Apr 1999. ISSN 0885-4513.

_____. Advances in microbial amylases. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 31 (Pt 2), p. 135-52, Apr 2000. ISSN 0885-4513.

PEDROLI, D. B. et al. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **Open Biotechnology Journal**, p. 9-18, 2009. ISSN 1874-0707.

PELCZAR JR, M. J. et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Pearson Makron Books, 2005. ISBN 8534604541.

PEREIRA, J. Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera. **Embrapa Agrobiologia. Documentos**, 2000. ISSN 1517-8498.

PETROVA, D.; VLAHOV, S. Taxonomic characterization of the thermophilic actinomycete strain 21E producer of thermostable Collagenase. 2013.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238-49, Jan 15 2011. ISSN 0008-543X.

PLNSN, S. D. et al. Antitumour property l-glutaminase on from *Aspergillus oryzae* through submergrd fermentation. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 3, n. 3, p. 819-823, 2014.

PRIDHAM, T.; HESSELTINE, C.; BENEDICT, R. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. **Applied microbiology**, v. 6, n. 1, p. 52, 1958.

PRIMAVESI, A. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. NBL Editora, 2002. ISBN 8521300042.

QIN, S. et al. Draft genome sequence of marine *Streptomyces* sp. strain W007, which produces angucyclinone antibiotics with a benz[a]anthracene skeleton. **J Bacteriol**, v. 194, n. 6, p. 1628-9, Mar 2012. ISSN 0021-9193.

RASHMI, R. et al. Partial purification and biochemical characterization of extracellular pectinase from *Aspergillus niger* isolated from groundnut seeds. **J. Appl. Biosci**, v. 9, n. 1, p. 378-384, 2008.

REVILLA, I.; JOSÉ, G. S. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. **International journal of food science & technology**, v. 38, n. 1, p. 29-36, 2003. ISSN 1365-2621.

REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. 2002

ROBERTS, J. et al. **Genetically engineered glutaminase and its use in antiviral and anticancer therapy**: Google Patents 2001.

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

RODRIGUES, R. C. et al. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized–stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1268-1273, 2010. ISSN 1359-5113.

RODRIGUES, R. M. A flora da Amazônia. **Belem: CEJUP 463p.-. Por (En) Geog**, v. 4, 1989.

SABU, A. Sources, properties and applications of microbial therapeutic enzymes. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 334-341, 2003. ISSN 0972-5849.

SABU, A. et al. L-Glutaminase production by marine *Beauveria* sp. under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 7, p. 705-710, 2000. ISSN 1359-5113.

SAXENA, A.; UPADHYAY, R.; KANGO, N. Isolation and identification of actinomycetes for production of novel extracellular glutaminase free L-asparaginase. **Indian J Exp Biol**, v. 53, n. 12, p. 786-93, Dec 2015. ISSN 0019-5189.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998. ISSN 1521-3773.

SCHRIJVER, A. D.; MOT, R. D. Degradation of pesticides by actinomycetes. **Critical reviews in microbiology**, v. 25, n. 2, p. 85-119, 1999. ISSN 1040-841X.

SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Structural and biochemical features of acidic alpha-amylase of *Bacillus acidicola*. **Int J Biol Macromol**, v. 61, p. 416-23, Oct 2013. ISSN 0141-8130.

SHARMA, O. P.; DAWRA, R. K. Thin-layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. **Journal of Chromatography A**, v. 587, n. 2, p. 351-354, 1991. ISSN 0021-9673.

SHIRLING, E. T.; GOTTLIEB, D. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst*, 1966, Citeaser.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957. ISSN 0003-6072.

SILVA, F. A. M. D. **Seleção de microrganismos com potencial de produção de compostos alelopáticos para o controle de plantas daninhas**. 2004. Universidade de São Paulo

SINGH, R.; KUMAR, V.; KAPOOR, V. Partial Purification and Characterization of a Heat Stable alpha-Amylase from a Thermophilic Actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. **Enzyme Res**, v. 2014, p. 106363, 2014. ISSN 2090-0406.

SINGH, S. A.; RAMAKRISHNA, M.; RAO, A. A. Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 411-417, 1999. ISSN 1359-5113.

SIQUEIRA, J.; MOREIRA, F. D. S. *Biologia e bioquímica do solo*. **Lavras, Universidade Federal de Lavras**, 2001.

SNELLMAN, E. A.; SULLIVAN, E. R.; COLWELL, R. R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 23, p. 5771-5779, 2002. ISSN 1432-1033.

SOMMER, P.; BORMANN, C.; GÖTZ, F. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3553-3560, 1997. ISSN 0099-2240.

SOUZA, G. H. B. D.; MELLO, J. C. P. D.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Editora UFOP, 2011. ISBN 8528802701.

SRINIVASAN, M. C.; LAXMAN, R. S.; DESHPANDE, M. V. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 7, n. 2, p. 171-84, Mar 1991. ISSN 0959-3993.

STAMFORD, T. L. et al. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresour Technol**, v. 83, n. 2, p. 105-9, Jun 2002. ISSN 0960-8524.

STUTZENBERGER, F. J. Inducible thermoalkalophilic polygalacturonate lyase from *Thermomonospora fusca*. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 6, p. 2774-2780, 1987. ISSN 0021-9193.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I.; WIECZOREK, J. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 8, p. 492-497, 1988. ISSN 0141-0229.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 5, p. 628-34, Sep-Oct 2010. ISSN 0734-9750.

THADIKAMALA, S.; REDDY, S. Modeling the effect of L-glutamine, aeration and agitation regimes on production of L-glutaminase in stirred tank reactor using *Bacillus subtilis* RSP-glu. **International Journal of Industrial Biotechnology**, v. 1, p. 27-33, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed, 2012. ISBN 8536326980.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. Atheneu, 2004. ISBN 8573796812.

TRANCHIDA, P. Q. et al. Analysis of macacaporanga (*Aniba parviflora*) leaf essential oil by using comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with rapid-scanning quadrupole mass spectrometry. **Chromatography Today**, p. 5-9, 2008.

TREJO-ESTRADA, S.; PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, D. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 1-2, p. 81-90, 1998. ISSN 1367-5435.

VASCONCELLOS, R. L. F. D. et al. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 6, p. 743-746, 2010. ISSN 0103-9016.

VENTURA, M. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 71, n. 3, p. 495-548, 2007. ISSN 1092-2172.

VERMELHO, A.; BASTOS, M.; BRANQUINHA, M. Bacteriologia geral. **Rio de Janeiro**, 2007.

VIIKARI, L.; TENKANEN, M.; SUURNÄKKI, A. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. In: (Ed.). **Biotechnology Set**: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. p.523-546. ISBN 9783527620999.

VUJAKLIJA, D. et al. A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. **Arch Microbiol**, v. 178, n. 2, p. 124-30, Aug 2002. ISSN 0302-8933.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer Science & Business Media, 1996. ISBN 3540586768.

WEI, Y.-S. et al. Composting and compost application in China. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 30, n. 4, p. 277-300, 2000. ISSN 0921-3449.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991. ISSN 0021-9193.

WHITAKER, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In: (Ed.). **Microbial enzymes and biotechnology**: Springer, 1990. p.133-176. ISBN 9401068305.

WILLIAMS, S.; SHARPE, M.; HOLT, J. **Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 4. Williams and Wilkins, London**. ISBN 0-68309-061-5. 1989

YUAN, D. et al. Screening and characterization of a thermostable lipase from marine *Streptomyces* sp. strain W007. **Biotechnol Appl Biochem**, Dec 30 2014. ISSN 0885-4513.

ZITOUNI, A. et al. Nocardiosis and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. **Res Microbiol**, v. 156, n. 10, p. 984-93, Dec 2005. ISSN 0923-2508.

ZOTCHEV, S. B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. **J Biotechnol**, v. 158, n. 4, p. 168-75, Apr 30 2012. ISSN 0168-1656.

APÊNDICE (S)

APÊNDICE A. Carta de aceite. Revista Brasileira de Farmácia.

Órgão Oficial da Associação Brasileira de Farmacêuticos

ISSN 0370-372x e ISSN 2176-0667

Rio de Janeiro, 18 de março de 2016.

Prezados autores, Silvia Katrine Silva Escher, José Jeosafá Vieira de Sousa Júnior, Adrielle Leal Dias, Janete Magali de Araújo & Elba Lúcia Cavalcanti Amorim

É com satisfação que informamos que o Produção de metabólitos anticandida por Streptomyces sp isolado de solo rizosférico da Amazônia" submetido sob o número 722/2015, foi aceito para publicação na Revista Brasileira de Farmácia (ISSN 2176-0667) e deverá ser publicado na versão online *no v. 97, n. 2, 2016*.

Atenciosamente,

Revista Brasileira de Farmácia
Carmelinda Monteiro Costa Afonso
Editora-Chefe

APÊNDICE B. Carta de aceite. African Journal of Microbiology Research.

http://ms.academicjournals.me/manuscripts/acceptance_cert/100269

academicJournals

OPEN ACCESS JOURNALS
<http://www.academicjournals.org/AJMR>

**African Journal of Microbiology
Research**

Acceptance Certificate

Date: 17-Apr-2016

Manuscript Number: AJMR/17.07.15/7674

Manuscript Title: ANTIFUNGAL SECONDARY METABOLITES FROM
ACTINOBACTERIA OF AMAZONIAN SOIL

Corresponding Author: Silvia Katrine Silva Escher

Corresponding Author Email: katrineescher@hotmail.com

Author(s): Escher Silvia Katrine Silva de Sousa Júnior José Jeosafá Vieira Dias
Adrielle Leal de Aquino Victor Hugo Rabelo de Araújo Janete Magali de
Amorim Elba Lucia Cavalcanti

Date Accepted: 12-Apr-2016



NOTICE

ANEXO(S)

ANEXO A. Composição dos meios de cultura.

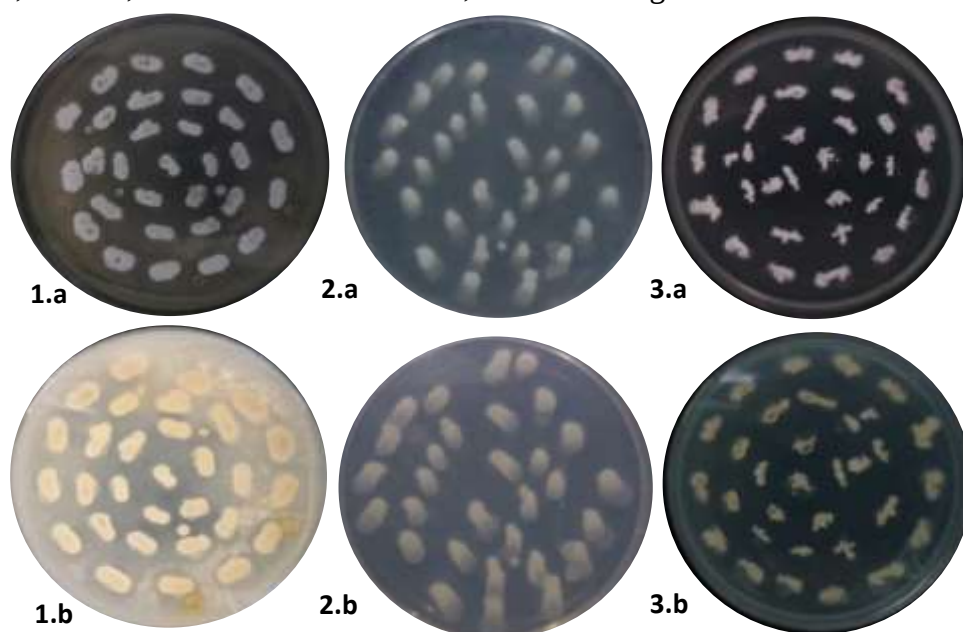
Substrato	ISP-1	ISP-2	ISP-3	ISP-4	ISP-5	BDA	ALA	TSA	AN	SDA	M1	MPE
Concentração (g/L)												
Ágar	15	15	15	15	15	15	17	15	15	15		
Amido solúvel				20								
Batata						200						
CaCO ₃				4							1	2
Extrato de carne									3			
Extrato de levedura	3	4	3	3			1					
Extrato de malte		10										
Farinha de aveia			20									
Farinha de soja											10	20
Glicerol					10					40		
Glicose		4				20	1				10	20
K ₂ HPO ₄				2	1		0.3					
L-Arginina							0.3					
L-asparagina					1							
MgSO ₄ .7H ₂ O				2			0.2					
NaCl				2			0.3	1.5	5		5	20
Peptona									10	10		
(NH ₄) ₂ SO ₄				4								
Peptona de soja								0.5				
Solução traço de sais*			1 mL	1 mL	1 mL		1 mL					
Triptona	5							1.5				
pH	7.0 - 7.2	7	7.0 - 7.4	7.0 - 7.4	7.0 - 7.4	6.8	7.0 - 7.4	7.3	6.9	5.6	7	6.7 - 7.0

* FeSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, MnCl₂. 4H₂O 0,1g/mL, ZnSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, Água destilada 100 mL, pH 7.0-7.4.

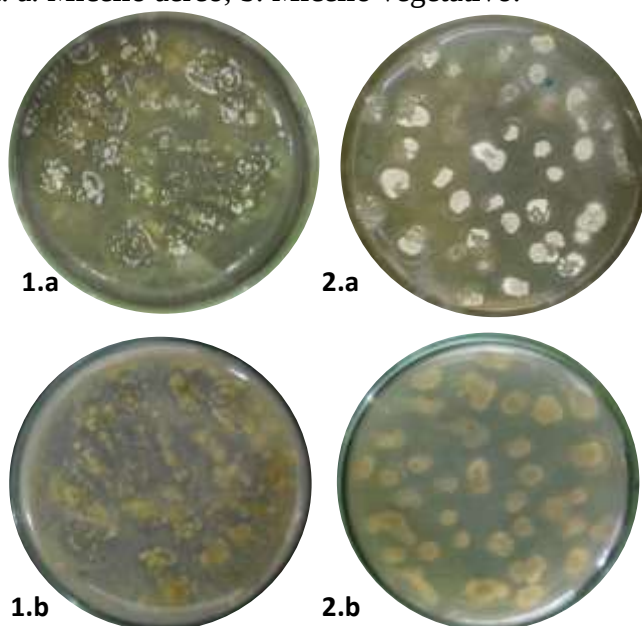
ANEXO B. Dados de nomenclatura inicial dos Isolados de actinobactérias de solo de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga).

Isolado	Correspondência	Placa de diluição
MPO1	1, 8, 9	10^{-3}
	17	10^{-4}
MPO2	2	10^{-3}
	14	10^{-4}
	24	10^{-5}
MPO3	3, 12	10^{-3}
	18	10^{-4}
MPO4	4, 11, 13	10^{-3}
MPO5	5, 10	10^{-3}
	15	10^{-4}
MPO6	6	10^{-3}
	16	10^{-4}
MPO7	7	10^{-3}
	21	10^{-4}
MPO8	8	10^{-3}
	23	10^{-5}
MPO9	9	10^{-3}
MPO10	10	10^{-3}
MPO11	11	10^{-3}

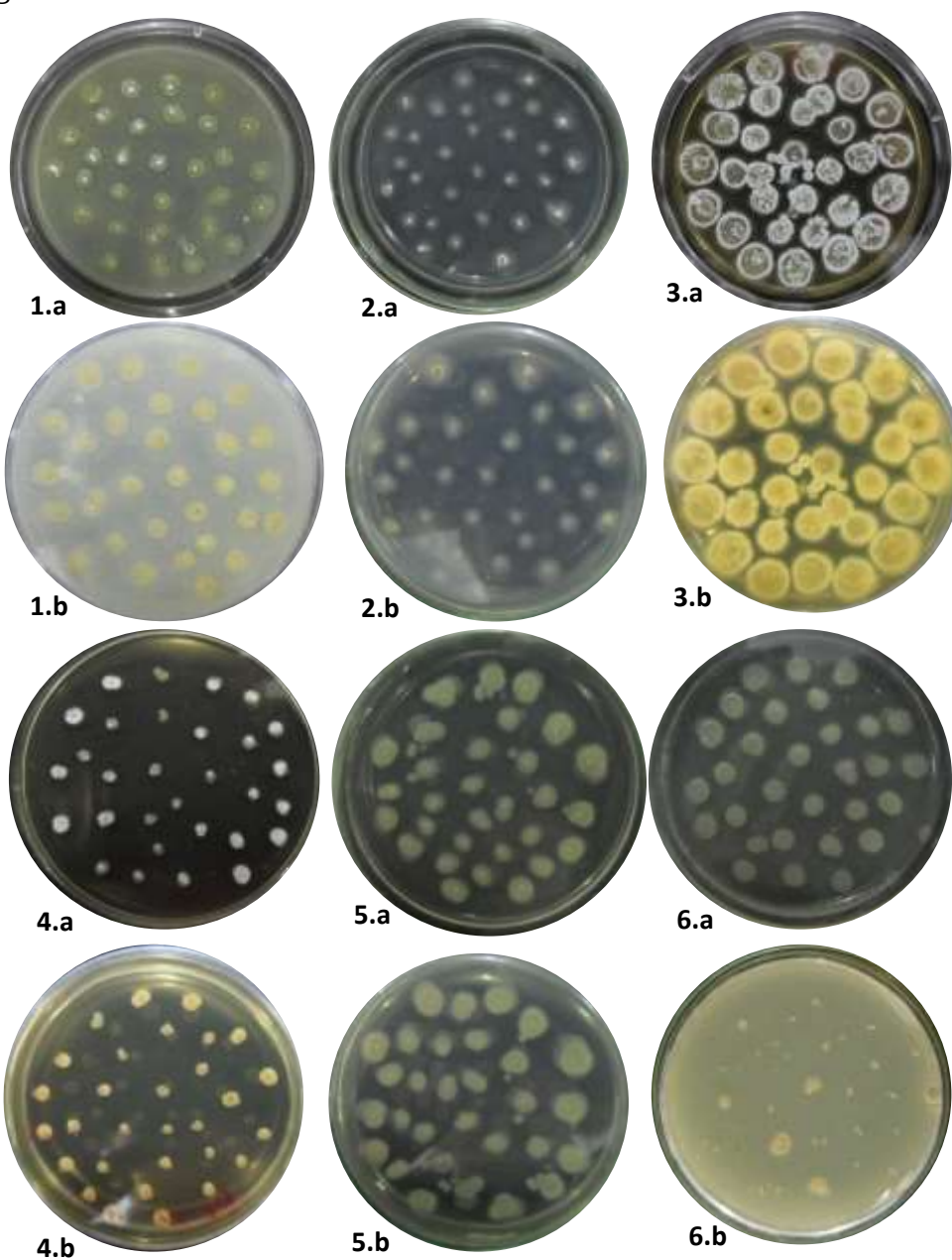
ANEXO C. Linhagem MPO1 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1. ISP4; 2. ISP5; 3. ALA. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



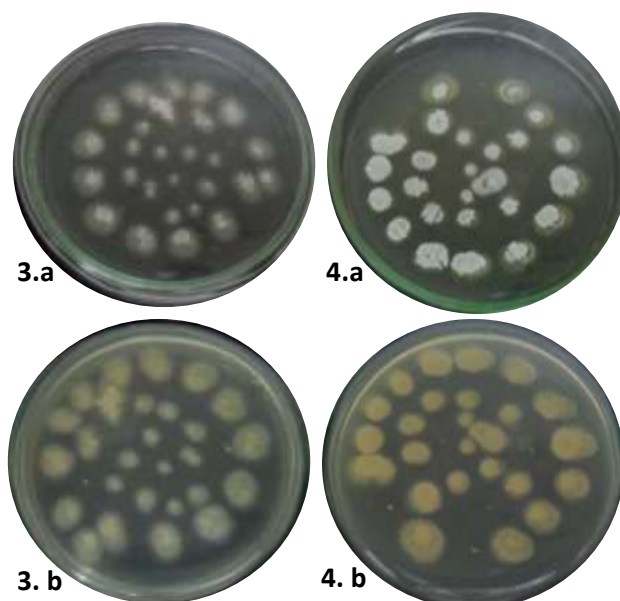
ANEXO D. Linhagem MPO2 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1. ISP3; 2. ALA. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



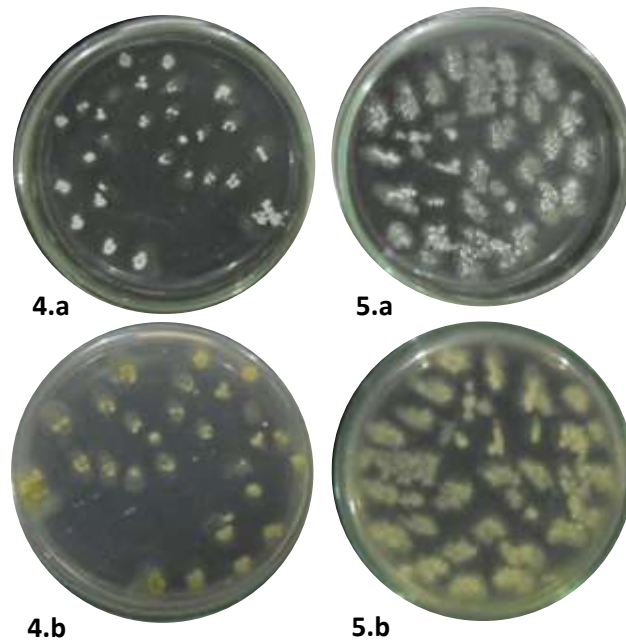
ANEXO E. Linhagem MPO3 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1. ISP4; 2. ALA; 3. SDA; 4. BDA; 5. TSA; 6. AN. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



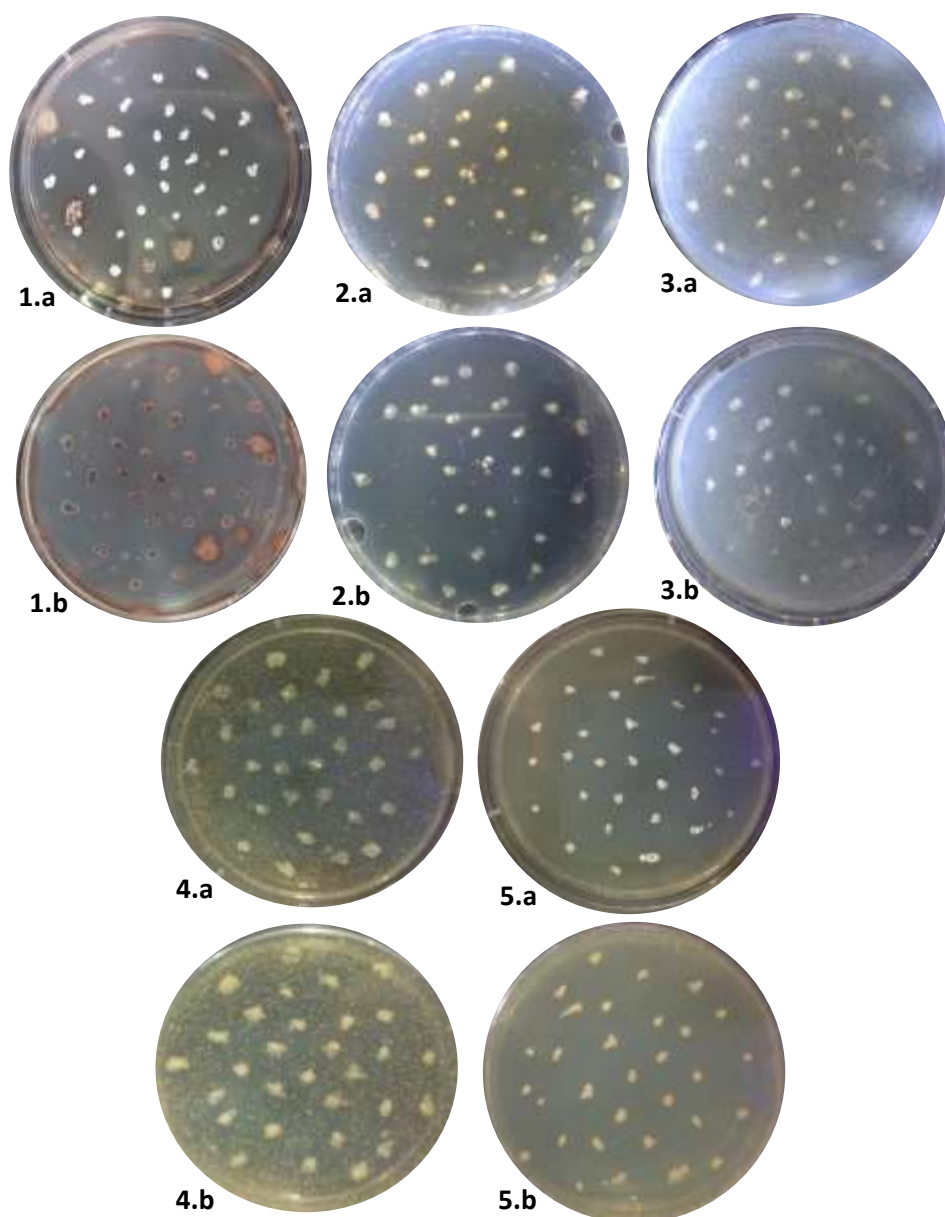
ANEXO F. Linhagem MPO4 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1.ALA; 2. AN. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



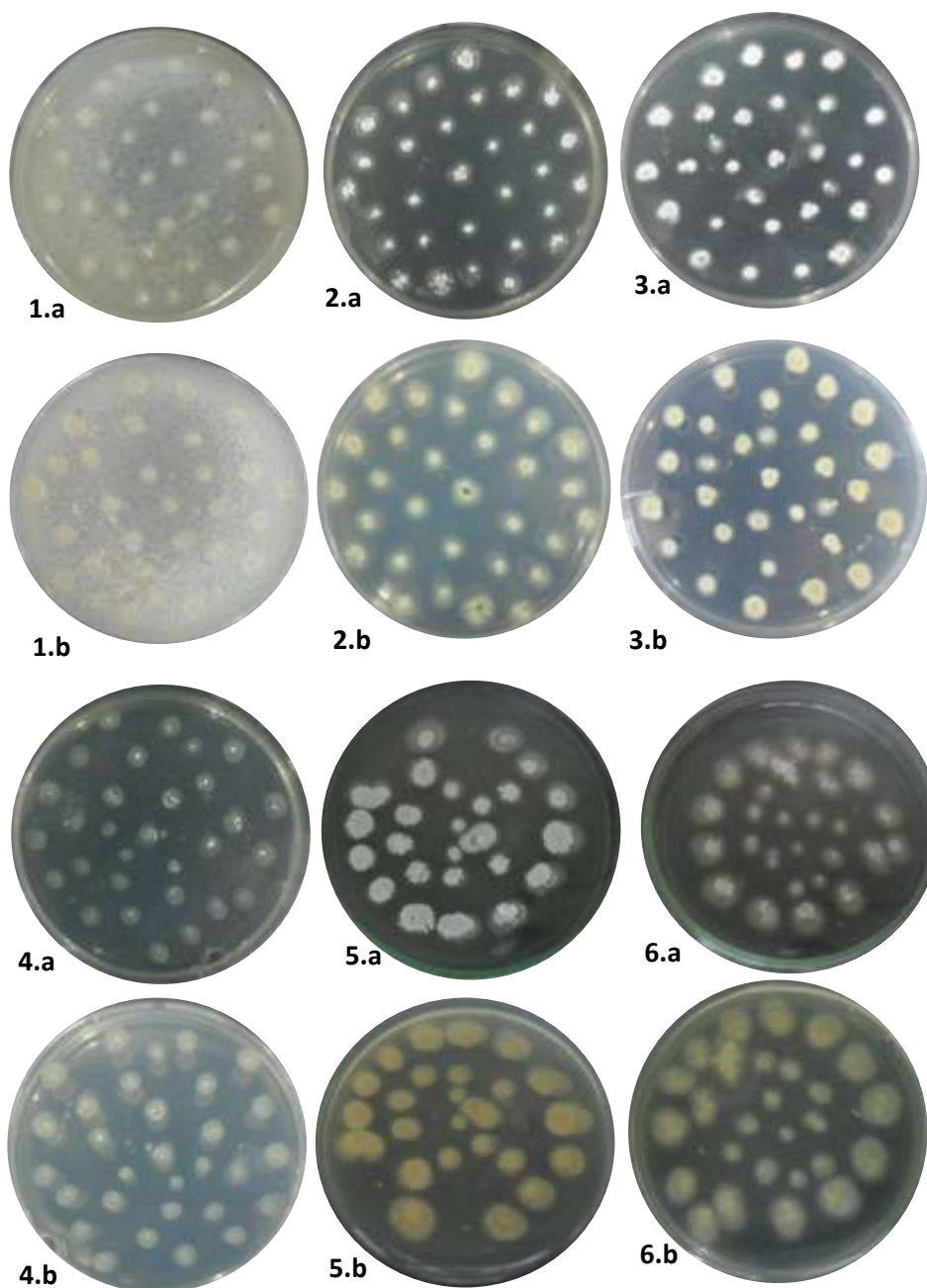
ANEXO G. Linhagem MPO5 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1. ALA; 2. AN. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



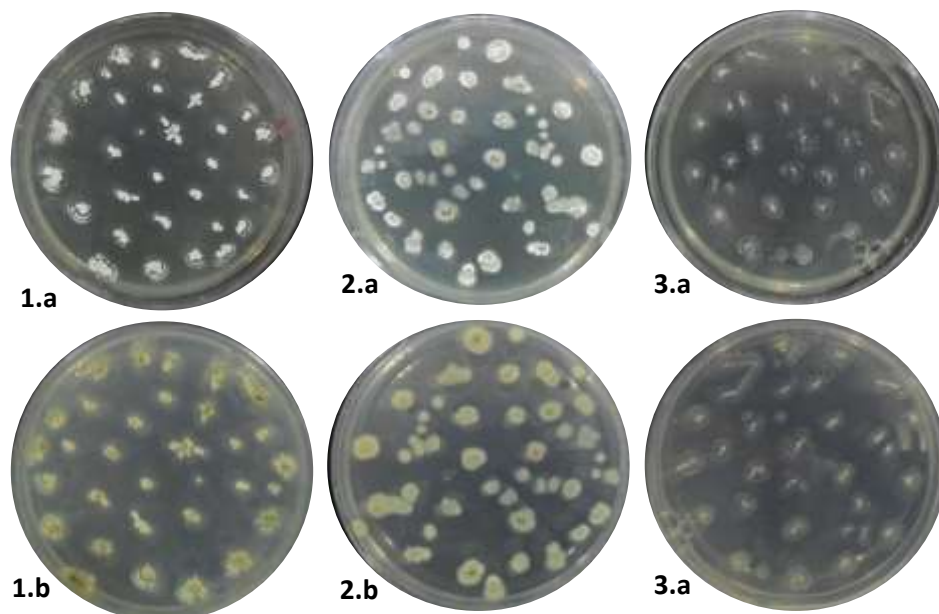
ANEXO H. Linhagem MPO6 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1.ALA; 2. CAA; 3. CZ; 4. TSA; 5. AN. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



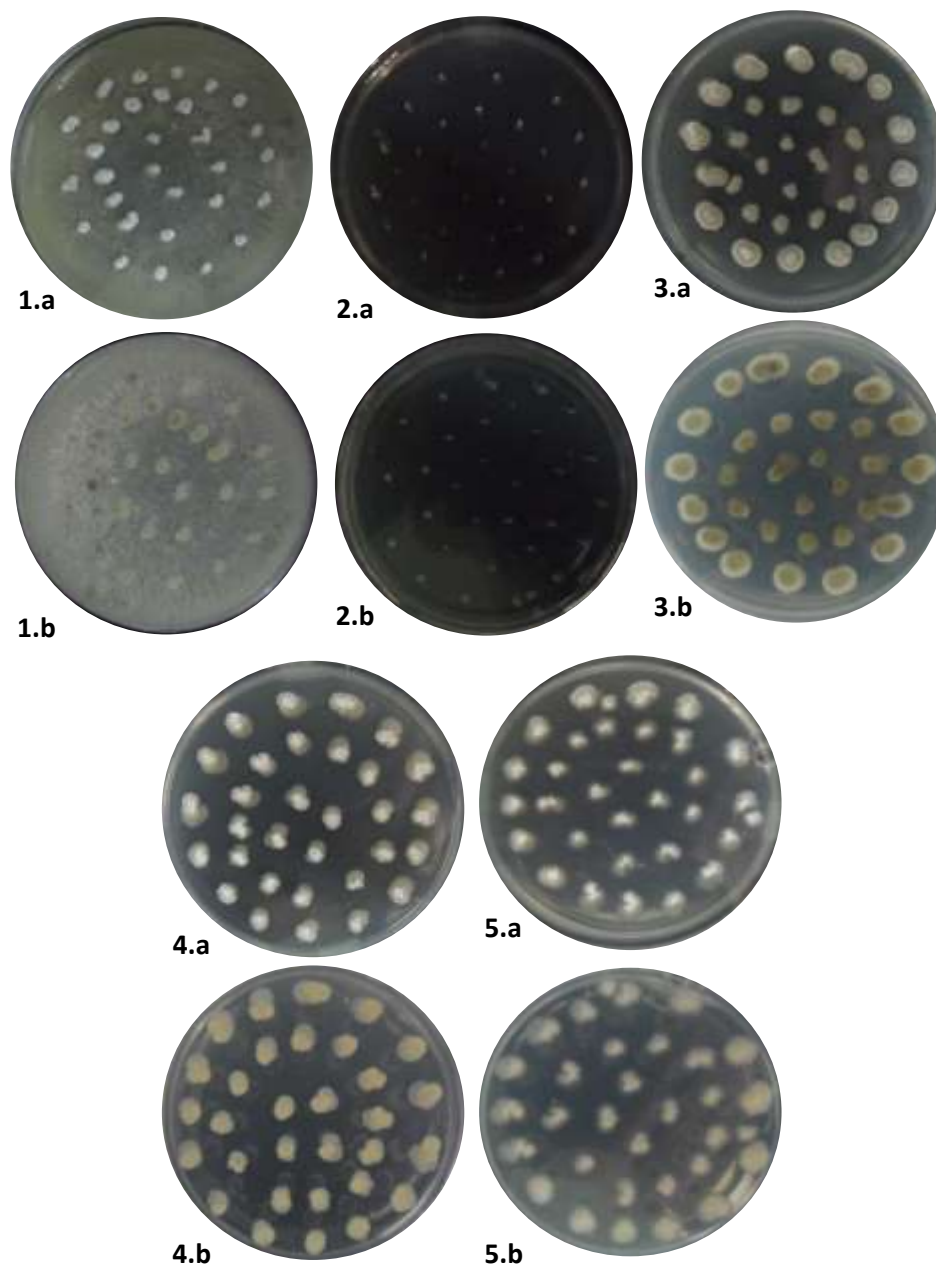
ANEXO I. Linhagem MPO7 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1. ISP4; 2. ALA; 3. GAA; 4. CAA; 5. AN; 6. TSA. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



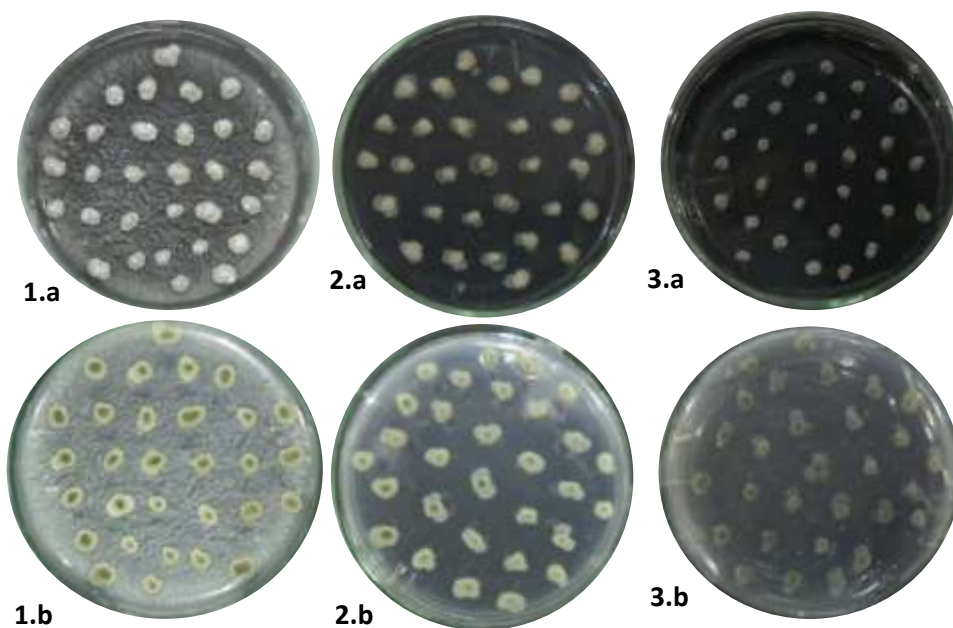
ANEXO J. Linhagem MPO8 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1. ALA; 2. GAA; 3. CAA. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



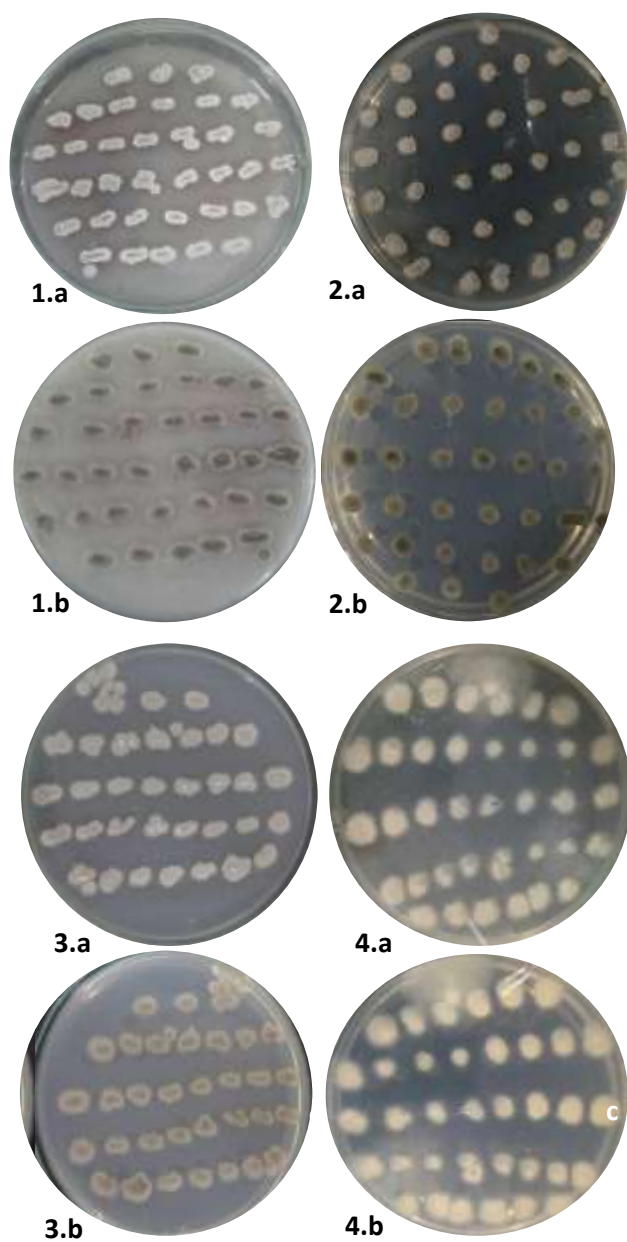
ANEXO K. Linhagem MPO9 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1. ISP4; 2. ISP5; 3. ALA; 4. GAA; 5. CAA. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



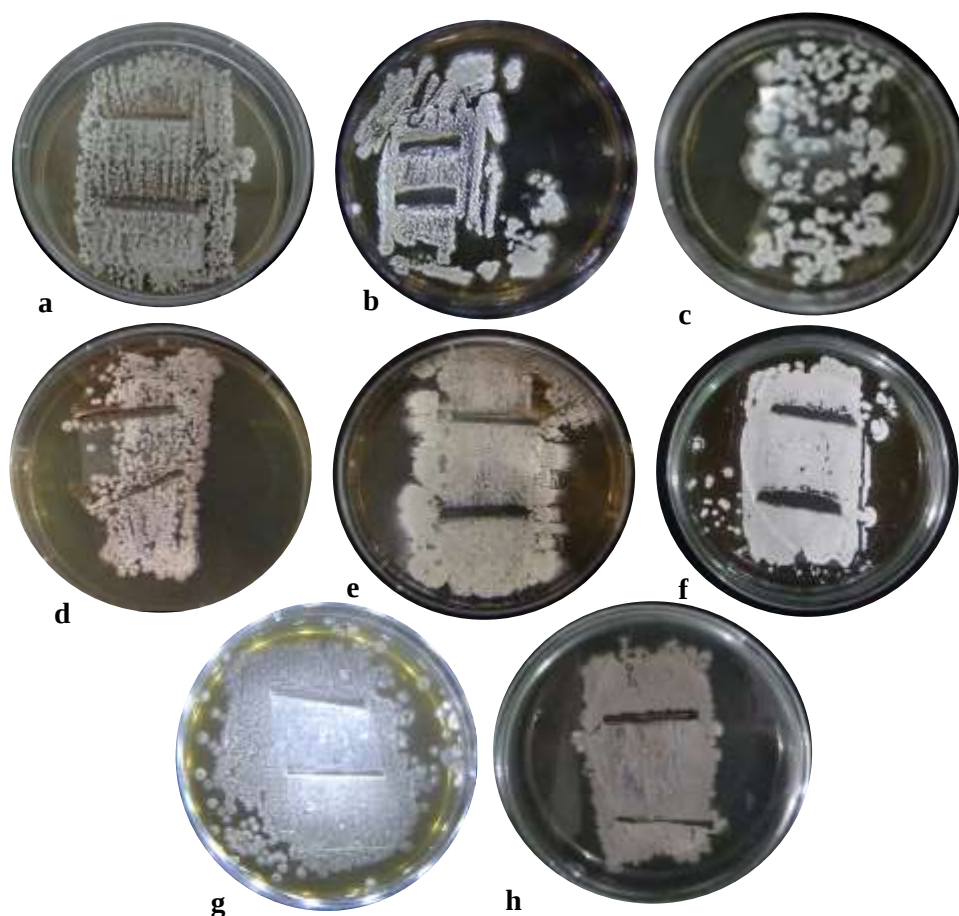
ANEXO L. Linhagem MPO10 nos diferentes meios de cultura após 7 dias de incubação à 37°C. 1. ISP4; 2. ISP5; 3. ALA. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



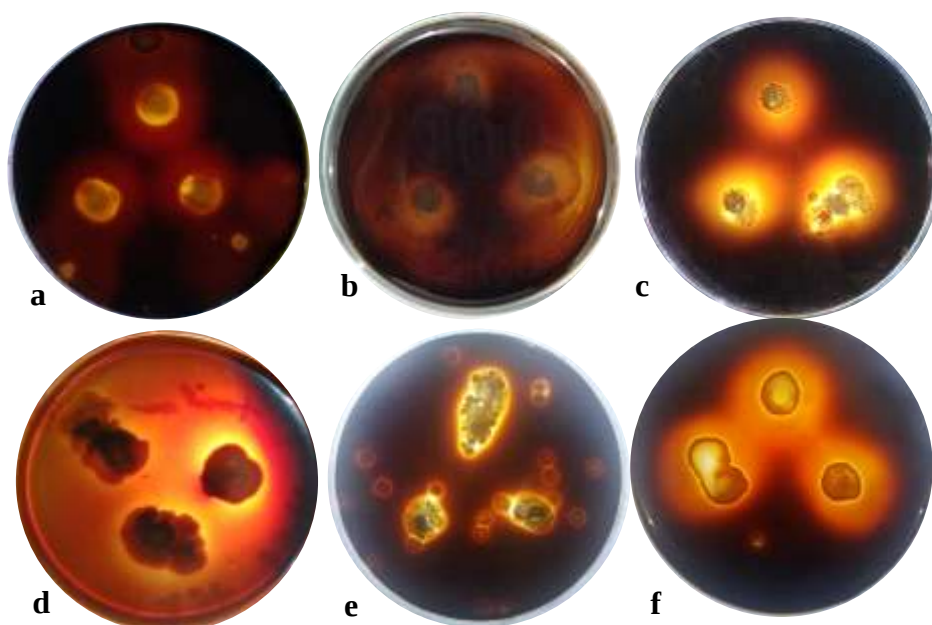
ANEXO M. Linhagem MPO11 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1. ISP4; 2. ALA; 3. GAA; 4. CAA. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.



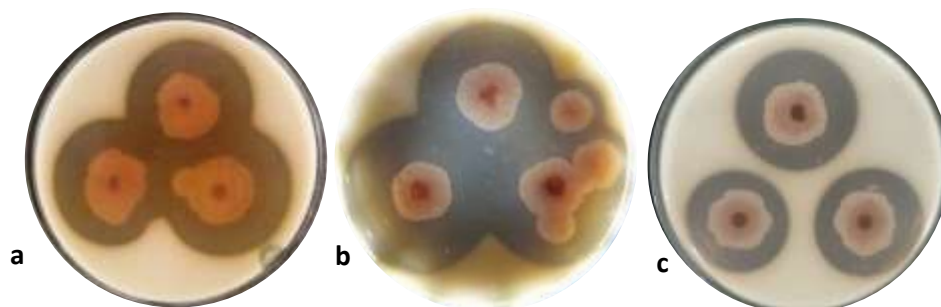
ANEXO N. Microcultivo das linhagens de actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga). 14 dias de crescimento à 37° C. a. MPO4, b. MPO5, c. MPO6, d. MPO7, e. MPO8, f. MPO9, g. MPO10, h. MPO11.



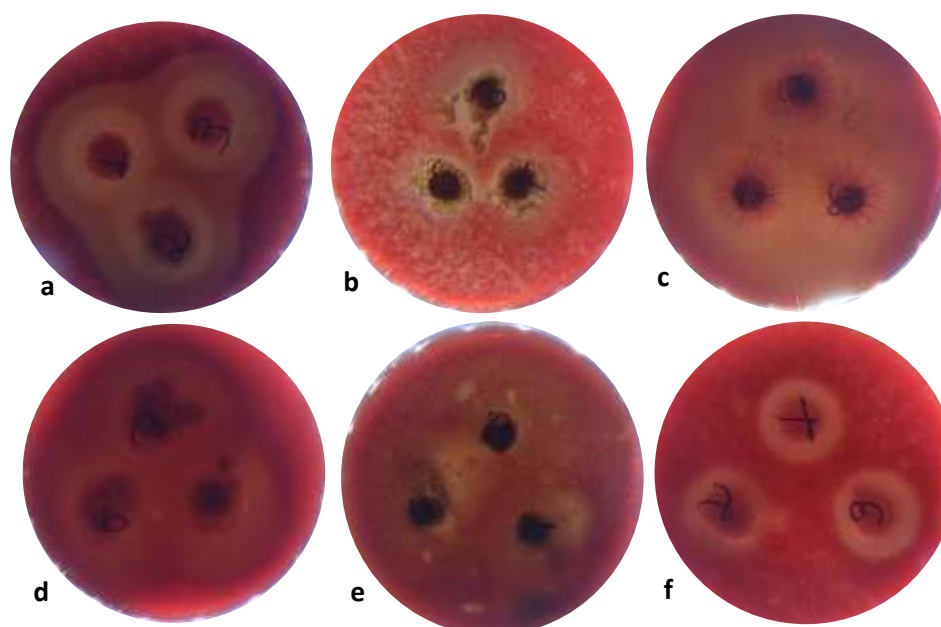
ANEXO O. Linhagens de actinobactérias produtoras de amilase. a. *Streptomyces* sp. MPO1, b. *Streptomyces* sp. MPO3, c. *Microbacterium xylanilyticum* MPO6, d. *Streptomyces* sp. MPO8, e. *Streptomyces* sp. MPO10; f. *Streptomyces* sp. MPO11.



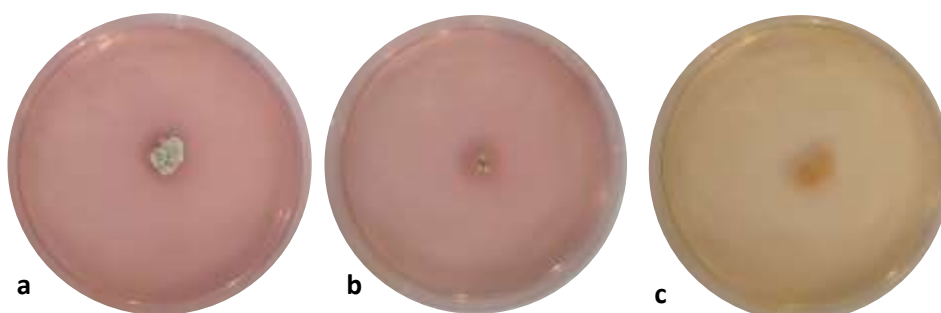
ANEXO P. Actinobactérias produtoras de caseinase. a. *Streptomyces* sp. MPO2, b. *Streptomyces* sp. MPO5, c. *Streptomyces* sp. MPO7.



ANEXO Q. Actinobactérias produtoras de hemólise em Meio Agar sangue. a. *Streptomyces* sp. MPO5; b. *Streptomyces* sp. MPO6; c. *Streptomyces* sp. MPO7; d. *Streptomyces* sp. MPO8; e. *Streptomyces* sp. MPO10; f. *Streptomyces* sp. MPO11.



ANEXO R. Linhagens de actinobactérias produtoras de L-glutaminase. a. *Streptomyces* sp. MPO8; b. MPO10 e c. MPO11



ANEXO S. Artigo publicado na Revista Brasileira de Farmácia.

VOLUME 97 SUPLEMENTO MAIO/AGOSTO 2016

REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA

Brazilian Journal of Pharmacy

PUBLICAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FARMACÊUTICOS

WWW.RBFARMA.COM.BR ISSN (online) 2176-0667

Produção de metabólitos anti-*Candida* por *Streptomyces* sp isolado de solo rizosférico da Amazônia

Silvia Katrine Silva Escher^{1*}, José Jeosafá Vieira de Sousa Júnior², Adrielle Leal Dias²,
Janete Magali de Araújo³ & Elba Lúcia Cavalcanti Amorim⁴

¹ Departamento de Antibióticos, UFPEDA, Programa de Pós graduação em ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco/ Laboratório de Microbiologia, Instituto de Saúde Coletiva, ISCO, Universidade Federal do Oeste do Pará.

² Laboratório de Microbiologia, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA, Brasil.

³ Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brasil.

⁴ Laboratório de Produtos Naturais - LAPRONAT, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Silvia Katrine Silva Escher

Laboratório de Microbiologia, UFOPA, Campus Tapajós

e-mail: silvia.escher@ufopa.edu.br Endereço: Rua Vera Paz, S/N, Salé, 68005-1000, Santarém – PA. Telefone: (93) 2101-4947 (93) 991755475.

Resumo

Neste trabalho foi avaliado o potencial antifúngico de *Streptomyces* sp MPO-4 (linhagem de *Streptomyces* isolado de solo rizosférico da Amazônia) isolado de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga). O potencial antifúngico foi avaliado através da técnica de bloco de Agar dispondo blocos circulares de 6mm de diâmetro em placas de Petri previamente semeadas com suspensão de *Candida albicans* e *Candida krusei*. A fermentação submersa ocorreu por 168h em meio ISP2, sendo o líquido fermentado coletado a cada 24h para avaliação da sua bioatividade pelo método de difusão em poços. O extrato bruto foi obtido após extração dos metabólitos secundários com Acetato de etila e, posteriormente avaliado a concentração mínima fungistática e fungicida através de microdiluição. O *Streptomyces* sp MPO-4 foi ativo contra *Candida albicans* e *Candida krusei* apresentando halos de inibição de 15.6mm e 14.0mm respectivamente. Os metabólitos antifúngicos foram produzidos a partir de 24h da fermentação apresentando halos de inibição entre 12.6mm e 25.3mm frente *Candida albicans* e 12mm e 17.3mm para *Candida krusei* a partir de 48h de fermentação. A concentração mínima fungicida para *Candida krusei* foi de 2000 µg/mL e para *Candida albicans* 1500 µg/mL. A actinobactéria *Streptomyces* sp. MPO-4 produz compostos bioativos de elevada ação antifúngica contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*.

Palavras-chave: *Streptomyces*, Produtos Biológicos, *Candida*.

Abstract

This study was evaluated the antifungal potential of *Streptomyces* sp MPO-4 (Lineage *Streptomyces* 4 isolated from Amazon soil) isolated from rhizosphere soil of *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga). The antifungal potential was evaluated through the agar block technique placing circular blocks with diameter of 6mm in Petri dishes previously seeded with *Candida albicans* and *Candida krusei* suspension. The submerged fermentation occurred in 168 h ISP2 media, the fermented liquid collected every 24 h for evaluation of its bioactivity by the well diffusion method. The crude extract was obtained after extraction of secondary metabolites with ethyl acetate, then posteriorly evaluate the minimum concentration fungistatic and fungicidal through by microdilution. The *Streptomyces* sp MPO-4 was active against *Candida albicans* and *Candida krusei* presenting inhibition zones of 15.6mm and 14.0mm respectively. The antifungal metabolites were produced from 24h fermentation presenting inhibition zones between 12.6mm and 25.3mm front *Candida albicans* and 12mm and 17.3mm for *Candida krusei* from 48h of fermentation. The fungicidal minimum concentration for *Candida krusei* was 2000µg/mL and *Candida albicans* 1500µg/mL. The actinobactéria *Streptomyces* sp. MPO-4 produces bioactive compounds with high antifungal activity against the yeast *Candida albicans* and *Candida krusei*.

Keywords: *Streptomyces*, Biological products, *Candida*.

INTRODUÇÃO

Os solos, dentre todos os habitats terrestres, abrigam a maior diversidade de espécies microbianas (Moreira & Siqueira, 2006), das quais se destacam as Actinobactérias. Este grupo compõe cerca de 12% a 20% da biomassa microbiana da rizosfera (Polyanskaya *et al.*, 2003) onde desempenham papel importante como a fixação de nitrogênio (Chaudhary *et al.*, 1981), decomposição de materiais orgânicos complexos como queratinas, quitinas, celuloses e amido, além de atuar na proteção das raízes das plantas hospedeiras contra fitopatógenos (Asolkar *et al.*, 2010; Dobrovol'skaya *et al.*, 2001).

As actinobactérias são bactérias Gram-Positivas, com alto conteúdo de G+C (guanina + citosina) em seu DNA, cuja bioquímica morfológica e relação com o oxigênio são extremamente diversificadas (RAJU *et al.*, 2010; Stach *et al.*, 2003), sendo característico seu desenvolvimento filamentosos semelhantes a hifas fúngicas (Azuma, 2011). Através do seu metabolismo secundário estas bactérias produzem vários compostos bioativos e aromáticos, como a geosmina, responsável pela produção de odor semelhante ao de terra molhada.

Este grupo de bactérias têm sido alvo da indústria farmacêutica, especialmente o gênero *Streptomyces*, o qual é responsável por produzir metabólitos secundários com variada estrutura química e atividade biológica como antitumorais, antiparasitários, anti-inflamatórios, imunossuppressores e antibióticos, os quais compõem cerca de 75% dos antibióticos usados na medicina e 60% dos antimicrobianos usados na agricultura (Lal, Solanki & Khanna, 2008; Moreira & Siqueira, 2006).

A busca por novos compostos bioativos efetivos frente às bactérias de interesse clínico e de fitopatógenos resistentes aos antibióticos utilizados na rotina clínica das doenças infecciosas e aos pesticidas de uso agrícola, têm sido alvo da indústria biotecnológica. Nesse sentido, pesquisas realizadas visando o conhecimento da ação antimicrobiana de metabólitos secundários provenientes de *Streptomyces* têm despertado um grande interesse, principalmente por ser atribuído a este gênero mais de 80% da matéria-prima para a elaboração de antibióticos desde 1940 (Azuma, 2011).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial antifúngico de *Streptomyces* sp MPO-4 isolado de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga) e avaliar a concentração mínima inibitória do extrato bruto obtido através de fermentação submersa.

MATERIAIS E MÉTODOS

ARTIGO ORIGINAL / RESEARCH

Foi realizado um estudo experimental, qualitativo e quantitativo com a cepa de actinobactéria *Streptomyces* sp. MPO-4, a qual foi obtida a partir de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga), coletado em zona de transição entre floresta ombrófila densa e savana, na floresta amazônica (Latitude 2° 28' 01.28" S Longitude 54° 49' 45.32" O) no município de Santarém – PA (Figura 1).

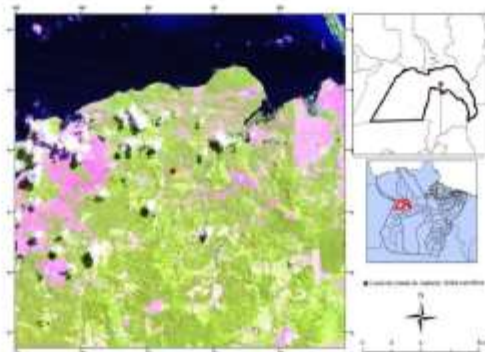


Figura 1. Mapa de coordenadas geográficas do ponto de coleta do solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga). Latitude 2° 28' 01.28" S Longitude 54° 49' 45.32"

Localização dos experimentos

Os ensaios foram realizados sob condições de laboratório, no Departamento de Antibióticos (UFPE/DA/UFPE) e Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), no período entre Dezembro de 2013 e Dezembro de 2014.

Obtenção dos micro-organismos

Os micro-organismos teste foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A cepa de *Streptomyces* sp faz parte da Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia (UFOPA). Para ativação da cepa, foi realizado um repique em meio ISP2 (Pridham *et al.*, 1957), em placa de Petri (60x15mm) incubada à 30°C por 168h para esporulação e colonização de toda a superfície do meio de cultura. Os micro-organismos teste foram mantidos em meio Nutriente (MN) em estufa à 32°C até a preparação das suspensões fúngicas utilizadas nos ensaios.

Avaliação de Antagonismo

Para a investigação do potencial antimicrobiano do *Streptomyces* sp. MPO-4 foi realizado um ensaio primário de antagonismo frente à cepas de *Candida albicans* (UFPE/DA1007) e *Candida krusei* (amostra clínica) por meio da técnica de bloco de Agar (Brown, Butterworth & Cole, 1976) e

ARTIGO ORIGINAL / RESEARCH

posteriormente foi realizado o a fermentação submersa para a obtenção dos compostos antimicrobianos em meio líquido ISP2 sob agitação durante 7 dias à 30°C.

Para o ensaio de bloco de gelose foram recortados blocos circulares de 6mm de diâmetro contendo as colônias de *Streptomyces* sp. Os blocos foram dispostos sobre placas de Petri (95x15mm) contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) previamente inoculado com 100µL das suspensões fúngicas ajustadas na escala de 0,5 MacFarland em meio nutriente (MN) em espectrofotômetro, à densidade óptica de 0,284 e comprimento de onda de 540nm, equivalente a 10^4 esporos/mL. Os blocos foram dispostos equidistantes 25mm proporcionando assim uma melhor visualização dos possíveis halos de inibição. As placas foram incubadas à 32°C por 48h. Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A produção de biocompostos com atividade antifúngica foi verificada pela formação de halos claros de inibição do crescimento da levedura e expressos em milímetros (mm). A intensidade da atividade inibitória foi classificada pelo tamanho da zona de inibição, o qual foi dividido em quatro grupos distintos: grupo passivo – zona de inibição menor que 10mm; grupo ligeiramente ativo – zona de inibição entre 11 e 20mm; grupo moderadamente ativo – zona de inibição entre 21 e 30 mm; e grupo altamente ativo, cuja zona de inibição é maior que 31mm (Sahin & Ugur, 2003).

Produção do antifúngico em meio líquido

Para a produção dos metabólitos antifúngicos foi realizado a fermentação submersa em meio ISP2 (4g de Extrato de levedura, 10g Extrato de malte, 4g Dextrose, 1000 mL de Água destilada, com pH inicial 7,0). Para o pré-inóculo foram utilizados erlenmeyers (250mL) contendo 50mL de meio de cultura ISP2 e adicionados três blocos de 6mm de diâmetro contendo a cultura de *Streptomyces* sp MPO-4. Os frascos foram mantidos em agitação de 180 rpm (Agitador magnético Fisatom® Modelo 751) à 30°C por 48h. Posteriormente 10% do volume do pré-inóculo foi transferido para erlenmeyers (500mL) contendo 250mL de meio de cultura ISP2, o qual foi mantido nas mesmas condições sendo a fermentação realizada durante 168h.

Para avaliação da atividade antifúngica à cada 24h o líquido fermentado foi centrifugado (927 g, 10 minutos) para precipitação da biomassa e do sobrenadante foi retirado uma alíquota para o teste pelo método de difusão em poços (Thakur *et al.*, 2009). Neste este ensaio, após a semeadura das suspensões fúngicas nas placas de Petri (95mmx15mm) contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), foram confeccionados poços cilíndricos de 6mm de diâmetro no qual foi dispensado 100µL do líquido fermentado. As placas foram incubadas à 37°C por 48h. A atividade

5 - 23

ARTIGO ORIGINAL / RESEARCH

antifúngica foi detectada pela presença de zonas de inibição em volta dos poços contendo o líquido fermentado, a qual foi expressa em milímetros. Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições. O ensaio foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas a 32°C por 48h. Os dados foram submetidos à análise estatística de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT 7.7 beta.

Extração do Antibiótico

O líquido fermentado foi filtrado em filtro de acetato celulose de 0,22µm de porosidade e o produto filtrado foi submetido à extração dos metabólitos secundários utilizando o solvente orgânico Acetato de etila na proporção de 2:1 do líquido fermentado. O processo de extração foi realizado em agitação mecânica por 1 hora à 180rpm, possibilitando assim a separação do líquido em duas fases distintas, a fase aquosa e a fase orgânica. Esta etapa foi realizada por mais duas vezes utilizando 200 mL e 100 mL do solvente em cada etapa de extração sob agitação mecânica por 30 minutos e 15 minutos à 180rpm, respectivamente. A fase orgânica de todas as etapas de extração foi concentrada em evaporador rotativo para a obtenção do extrato bruto.

Avaliação da Concentração mínima inibitória (CIM) do extrato bruto de *Streptomyces* sp MPO-4

O extrato bruto da fermentação foi empregado para determinar a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição conforme *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS, 2002). Em uma microplaca estéril de 96 orifícios foi dispensado no poço C3 a solução mãe (SM) à 5000µg/mL a partir do extrato bruto solubilizado em 100µL de Dimetilsulfóxido à 5% (DMSO) e 900µL de meio de cultura (MC) Sabouraud dextrose no poço. Posteriormente foi preparado o sistema de concentrações decrescentes nos poços C4 à C11 nas seguintes condições: C4 (4500µg/mL): 90µL (SM) + 10µL de (MC); C5(4000µg/mL): 80µL da (SM) + 20µL do (MC); C6 (3500µg/mL): 70µL da (SM) + 30µL do (MC); C7(3000µg/mL): 60µL da (SM) + 40µL do (MC); C8(2500µg/mL): 50µL da (SM) + 50µL do (MC); C9(2000µg/mL): 40µL da (SM) + 60µL do (MC); C10(1500µg/mL): 30µL da (SM) + 70µL do (MC); C11(1000µg/mL): 20µL da (SM) + 80µL do (MC). Em cada poço foi adicionado 10µL do inóculo fúngico. A mudança de coloração inicialmente vermelha para azul indicou a viabilidade do micro-organismo.

A Concentração mínima fungicida foi determinada pela subcultura dos poços azuis do teste de determinação da CIM em placa de Petri contendo o meio sólido Sabouraud Dextrose Ágar (SDA). As placas foram incubadas à 37°C por 48-72h, sendo que cada amostra foi testada em quatro experimentos independentes.

RESULTADOS

Na figura 2 pode ser observado as colônias de *Streptomyces* sp MPO-4, o qual foi ativo contra *Candida krusei* e *Candida albicans* sendo registrados halos de inibição de crescimento fúngico de $14 \pm 1\text{mm}$ e $15.6 \pm 0.58\text{mm}$ em 48h, respectivamente.



Figura 2: A. Cultura de *Streptomyces* sp MPO-4 em Meio ISP2 após 7 dias de incubação à 35°C.

A atividade antifúngica do líquido fermentado variou em relação ao tempo de fermentação apresentando halos de inibição de crescimento entre 12.6mm e 25.3mm para *Candida albicans* e 12mm e 17.3mm para *Candida krusei* (Tabela 1). O líquido fermentado foi ativo desde as 24h para *Candida albicans* e à partir de 48h para *Candida krusei*, sendo que o melhor período de produção do antifúngico foi em 96h de fermentação, apresentando halos de inibição de crescimento de 25.3mm e 17.3mm para *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente (Figura 3).

Registro da atividade antimicrobiana do líquido metabólico

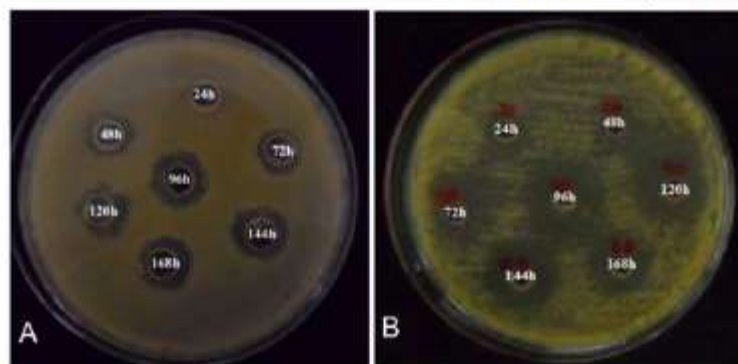


Figura 3: Halos de inibição registrados no ensaio de atividade Antifúngica do Líquido Fermentado de *Streptomyces* sp MPO-4. A. *Candida krusei*. B. *Candida albicans*.

Valor dos halos de inibição do líquido fermentado

Os valores da MIC obtidos para *Candida krusei* foram de 1500 $\mu\text{g/mL}$ e para *Candida albicans* <de 500 $\mu\text{g/mL}$. A concentração mínima fungicida para *Candida krusei* foi > de 1500 $\mu\text{g/mL}$ e para *Candida albicans* 1500 $\mu\text{g/mL}$. A concentração final do DMSO, agente de solubilização do extrato utilizado no ensaio não influenciou na inibição do crescimento das leveduras teste.

Tabela 1: Atividade antifúngica do líquido fermentado apresentando os halos de inibição de crescimento microbiano (mm).

Tempo de fermentação	Micro-organismo	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
24h	12.6 $\pm$ 0.58 ^{aF}	0.0
48h	15.3 $\pm$ 0.58 ^{aE}	12.0 $\pm$ 0 ^{bC}
72h	22.0 $\pm$ 0 ^{aC}	15.0 $\pm$ 0 ^{bB}
96h	25.3 $\pm$ 0.58 ^{aA}	17.3 $\pm$ 0.58 ^{bA}
120h	24 $\pm$ 1.73 ^{aAB}	16.0 $\pm$ 0 ^{bAB}
144h	23.0 $\pm$ 1.00 ^{aBC}	15.6 $\pm$ 0.58 ^{bAB}
168h	18.6 $\pm$ 0.58 ^{aD}	15.0 $\pm$ 0 ^{bB}

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Vários são os estudos realizados com actinobactérias isoladas de solos, principalmente da rizosfera, comprovando o grande potencial bioativo desses micro-organismos. A grande maioria dos *Streptomyces* demonstra uma ampla atividade antagonista que inclui ação frente à bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentos e leveduriformes (Salamoni *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2009).

Resultados semelhantes à este estudo foram encontrados por Bajaj & Sharma (2011) descreveu a relação antagonista de seis actinomicetos isolados de diferentes locais de Punjab e Himachal na Índia contra *Candida albicans* sendo as linhagens 2A, A26 e R3YS as mais ativas com halos de inibição de 14.6mm, 11.6 mm e 13.6mm, respectivamente.

O meio ISP2 mostrou-se como boa alternativa para a obtenção dos metabólitos bioativos com atividade antifúngica através da fermentação submersa (Cunha *et al.*, 2009). Este meio de cultura tem sido descrito como melhor meio para produção de metabólitos antimicrobianos para fermentação do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA, o qual obteve melhores halos de inibição a partir do líquido fermentado de 72h de fermentação com (4%) de fonte de carbono (glicose), sendo registrados halos de inibição de crescimento de 24,5mm com 72h de cultivo (Salamoni, Van Der Sand & Germani, 2012).

O potencial antimicrobiano de 25 espécies de actinobactérias do gênero *Streptomyces* foi descrito através da fermentação utilizando meio mineral de caseína e amido e meio ISP2, onde 80% dos isolados foram capazes de inibir pelo menos uma das bactérias testadas (Cunha *et al.*, 2009). Em outro estudo o melhor rendimento de metabólitos antimicrobianos com o *Streptomyces* sp 1S ocorreu em fermentação em meio ISP2 à 28°C, sendo que o líquido fermentado de 24h foi ativo contra *C. albicans* e *Fusarium oxysporum* (Salamoni *et al.*, 2010).

Neste estudo as cepas de *Candida krusei* foram mais resistentes aos metabólitos secundários apresentando uma concentração mínima fungicida (CMF) superior à 1500 µg/mL, similar relatado em outros estudos que apresentaram CMF de 2500µg/mL para *Candida albicans* (Salamoni, Van Der Sand & Germani, 2012; El-Naggar, El-Assar & Abdul-Gawad, 2006). A produção de metabólitos secundários anticandida de *Streptomyces* spp SP1 contra as espécies de *Candida albicans* e *Candida krusei* apresentou atividade fungicida entre 625 µg/mL (Oliveira *et al.*, 2013).

CONCLUSÃO

ARTIGO ORIGINAL / RESEARCH

A actinobactéria *Streptomyces* sp MPO-4 isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* (Macacaporanga) produz compostos bioativos de elevada ação antifúngica contra a levedura *Candida albicans* e *Candida krusei*. A otimização do processo de obtenção dos metabólitos antifúngicos ocorreu na condição de 96h de fermentação sob agitação em meio ISP2. A bioprospecção de micro-organismos com potencial biotecnológico vem possibilitando o emprego de produtos bioativos nas mais diversas áreas do conhecimento, e o isolamento destes micro-organismos presente em solos diferenciados como o solo da Amazônia assim como a elucidação dos compostos bioativos são alvos do nosso grupo e se apresentam como uma possibilidade de desenvolvimento científico local gerando impacto imediato na indústria agrícola, farmacológica, alimentícia e de cosmético, implicando assim no desenvolvimento social e econômico da Amazônia.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pelo apoio financeiro, ao Laboratório de Microbiologia da UFOPA e ao Departamento de Antibióticos da UFPE pela colaboração na pesquisa.

REFERENCIAS

- Asolkar RN, Kirkland TN, Jensen PR, Fenical W. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Antibiot.* 63(1): 37-39, 2010.
- Azuma, MVP. *Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil*. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- Bajaj BK & Sharma P. An alkali-thermotolerant extracellular protease from a newly isolated *Streptomyces* sp. DP2. *N. Biotechnol.* 28(6): 725-732, 2011.
- Brown AG, Butterworth D, Cole M. Naturally occurring β -Lactam inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiot.* 29(1): 668-669, 1976.
- Chaudhary A, Khokhar N S, Zafar Y, Hafiez F. Actinomycetous root nodules in angiosperms of Pakistan. *Plant Soil.* 60(3): 341-348, 1981.
- Cunha IGB, Sobrinho T, Silva R, Amorim E, Araújo J. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. *Rev. Bras. Farm.* 90(2):120-123, 2009.
- Dobrovol'skaya TG, Lysak LV, Zenova, GM, Zvyagintsev, DG. Analysis of soil bacterial diversity: Methods, potentiality, and prospects. *Microbiology.* 70(2): 119-132, 2001.

ARTIGO ORIGINAL / RESEARCH

El-Naggar MY, El-Assar SA, Abdul-Gawad SM. Meroparamycin Production by Newly Isolated *Streptomyces* sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation, Purification and Structural Elucidation. *J. Microbiol.* 44(4): 432-438, 2006.

Solanki R, Khanna M, Lal R. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian journal of microbiology*, 48(4): 410-431, 2008.

Moreira FMS & Siqueira JO. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: norma aprovada - M27-A2. 2.ed. Wayne, 2002.

Oliveira JHL, Granato AC, Hirata DB, Hokka CO, Barboza M, Trisic M. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. *Quim. Nova.* 32(8), 2142-2150, 2009.

Oliveira TL, Lima EO, Fernandes HM B, Filho Abrahão AO, Souza IA. Atividade antifúngica de extratos isolados de *Streptomyces* spp obtidos em solos paraibanos contra leveduras do gênero *Candida* spp. *Biofar. Rev. de Biol. Farm.* 9(1): 1-6, 2013.

Polyanskaya LM, Ozerskaya SM, Kochkina GA, Ivanushkina NE, Golovchenki AV, Zvyagintsev DG. The quantity and structure of the root-associated microbial complexes of two greenhouse rose cultivars. *Mikrobiol.* 72(4): 554-562, 2003.

Pridham TG, Anderson P, Foley C, Lindenfesler LA, Hesseltine CW, Benedict RG. A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes. *Antibiot. Ann.* 1956-7 (1957): 947-953, 1957.

Raju A, Piggott AM, Conte M, Tnimov Z, Alexandrov K, Capon RJ. Nocardiopsis: new FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. *Eur. J. Chem.* 16(10): 3194 – 3200, 2010.

Sahin N & Ugur A. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. *Turk J. Biolog.* 27(2): 79-82, 2003.

Salamoni SP, Mann MB, Campos FS, Franco AC, Germaniand JC, Van Der Sand ST. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26(10): 1847-1856, 2010.

Salamoni SP, Van Der Sand ST, Germani JC. Estudo de Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp. 1S. *Evidência- Ci. Biotecnol.* 12(2): 175-186, 2012.

Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ. Microbiol.* 5(10): 828-841, 2003.

Thakur D, Bora TC, Bordoloi GN, Mazumdar S. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *J. Mycol. Med.* 19(3): 161-167, 2009.

Influence of glucose and stirring in the fermentation process in order to produce anti-*Candida* metabolites produced by *Streptomyces* sp.

Silvia Katrine Silva Escher^{1,2,*}, José Jeosafá Vieira de Sousa Júnior², Adrielle Leal Dias²,
Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim¹, Janete Magali de Araújo¹

¹Microbiology Laboratory, UFOPA, Department of Antibiotics, UFPEDA, Program of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil, ²Microbiology Laboratory, UFOPA, Institute of Collective Health, UFOPA, Federal University of West Para, Santarém, PA, Brazil, ³Natural Products Laboratory, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil

This study evaluated the influence of glucose and stirring in the fermentation process in order to produce anti-*Candida* metabolites produced by *Streptomyces* sp. MPO4 isolated from Amazon soil. The anti-*Candida* metabolites production was registered after 24 h of fermentation in stirred ISP2 medium, having antifungal inhibition halos between 12.3 mm and 25.3 mm, yielding higher production of anti-*Candida* agents after 96 h. Stirring was a determining factor for the production of anti-*Candida* secondary metabolites, since the absence of glucose reflected in the late production of the antifungal starting from *Streptomyces* sp.

Uniterms: *Streptomyces* sp./anti-*Candida* activity, anti-*Candida* metabolites/production, Fermentation.

Este estudo avaliou a influência da glicose e agitação no processo de fermentação para a produção de metabólitos anti-*Candida* produzidos por *Streptomyces* sp. MPO4 isolado do solo da Amazônia. A produção dos metabólitos anti-*Candida* foi registrada a partir de 24 h de fermentação sob agitação em meio ISP2, apresentando halos de inibição entre 12,3 mm e 25,3 mm, obtendo-se maior produção do antifúngico em 96 h. A agitação foi um fator determinante para a produção de metabólitos secundários anti-*Candida* e a ausência de glicose refletiu na produção tardia do antifúngico a partir do *Streptomyces* sp.

Unitermos: *Streptomyces* sp./atividade anti-*Candida*, Metabólitos anti-*Candida*/produção, Fermentação.

INTRODUCTION

The bioactive compounds of microbial origin are produced by specific groups of bacteria and eukaryotic microorganisms such as Actinomycetes, Thermobacteria, *Pseudomonas* and the *Cyanobacteria* and most of filamentous fungi.

Actinobacteria are Gram-positive filamentous bacteria group with high capacity to produce several secondary metabolites (Jørgensen *et al.*, 2010; Karupiah

et al., 2013; Prakash *et al.*, 2013; Kim, Yang, Yoon, 2015). They are usually isolated from soil consisting in about 30% of the microbial population (Goodfellow, Fiedler, 2010). In this group the *Streptomyces* genus are widely studied for its abilities to produce bioactive compounds used in the synthesis of about 70% of the antibiotics of choice in the treatment of microbial infections (Lacaz *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2012; Rashad *et al.*, 2015) and 60% are used in agriculture.

Actinomycetes may be exist in various habitats such as water, soil and plants, which are estimated for each gram of soil there are about 10^6 - 10^9 Colony Forming Units (CFU) by actinomycetes. Its wide distribution is justified because these bacteria are not very demanding in terms of

*Correspondence: S. K. S. Escher, Departamento de Antibióticos, Programa de Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 - Cidade Universitária, Recife - CEP: 50670-901. E-mail: silvia.escher@ufopa.edu.br

the substrate for growth, as they are described autotrophic, heterotrophic, chemotrophic or phototrophic (González *et al.*, 2005).

In addition to antibiotics, metabolites related with the following activities: anti-inflammatory, antiparasitic, antiviral, antiprotozoal, immunomodulators, antitumor (Kim *et al.*, 2012; Karupiah *et al.*, 2013; Manivasagan *et al.*, 2014; Rashad *et al.*, 2015) and vitamins (Shin *et al.*, 2007; Arumugam *et al.*, 2010) have also been isolated by fermentation processes of these bacteria (Manivasagan *et al.*, 2014; Rashad *et al.*, 2015).

This secondary metabolites is obtained by fermentative processes. The nature and concentration of nutrients in the medium such as carbon, nitrogen, phosphorus and minerals as well as the essential substances for biosynthetic pathway can promote the production of larger quantities of one or another compound inferring directly on its performance (Gupte, Kulkarni, 2002; Chen *et al.*, 2012; El-Naggar *et al.*, 2015).

Among the external factors with influence at the biosynthesis of secondary metabolites by microorganisms, the sources of carbon and nitrogen are highly relevant, since they are related to both substrate availability for the synthesis of metabolites as to the modulation of the enzymatic process and may activate and stabilize the enzymes involved in the process (Gupte, Kulkarni, 2002; El-Naggar *et al.*, 2015).

Sugars such as glucose are routinely used as a carbon source for the growth and secondary metabolite production during fermentation. However, the production of some metabolites is suppressed by the inhibition of any enzyme involved in the process and consequently leads to activation of other metabolic pathways (El-Naggar *et al.*, 2015; Sanchez, Quintero, Ochoa, 2015).

Both stirring or aeration favors the development of primary metabolism of aerobic microorganisms, especially during the multiplication stage, thus favoring the complete transformation of the sources of carbohydrates present in the fermentation medium (Muller *et al.*, 2007).

The search for new bioactive compounds especially those with effective antimicrobial compounds against multiresistant microorganisms as *Candida* species can contribute to the control of this microorganism commonly associated with nosocomial infections. The increasing incidence of multidrug-resistant organisms is a major public health problem, especially *Candida albicans*, which although it is considered a commensal inhabitant of various parts of the body, particularly the gastrointestinal and genital tract, is associated with many cases of hospital infection, including the ability to promote primary infections in immunocompromised patients. (Avrella,

Goulart, 2008; Giolo, Svidzinski, 2010).

This study evaluated the influence of the glucose presence and stirring to produce compounds with anti-*Candida* activity produced by *Streptomyces* sp. MPO-4 isolated from rhizosphere soil of Amazon.

MATERIAL AND METHODS

Streptomyces sp. MPO4 strain

The *Streptomyces* sp. MPO-4 used in this study was obtained from the collection of the culture of Microbiology Laboratory of the Federal University of West Para. The lineage is a rhizosphere actinomycete from the tree *Aniba parviflora* syn *A. fragans* (Macacaporanga) and was isolated from the transition area between dense forest and savanna in the Amazon rainforest (2028°S and 54049°W) in Santarém - PA (Figure 1).

The *Streptomyces* sp. MPO4 was isolated on Agar Yeast Arginine medium (AYA: 0.3 g L-arginine, 1 g glucose, 1 g glycerol, 0.3 g K_2HPO_4 , 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3 g NaCl, 1 g yeast extract, 1 mL Salt Solution [0.1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.1 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mL distilled water, pH 7.0-7.4], 17 g agar, 1000 mL distilled water, pH 6.4) (Nonomura, Ohara, 1969) plus nystatin (100 µg/mL) at 30 °C for 14 days from the serial dilution (10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} CFU/mL) of 10 g soil adhered to the plant root in 90 mL of phosphate buffer. The morphological identification was made through evaluation of cultural characters and micromorphology (Williams, Sharpe, Holt, 1989).

Anti-*Candida* activity

Streptomyces sp. MPO-4 was grown on ISP2 medium (International *Streptomyces* Project: 4 g yeast extract, 10 g malt extract, 4 g glucose, 15 g agar, 1000 mL distilled water, pH 7.2) (Shirling, Gottlieb, 1966) in Petri dish (60 × 15 mm) incubated at 30 °C for 168 hours for sporulation and colonization of the entire surface of the culture medium.

The evaluation of the anti-*Candida* activity of *Streptomyces* sp. MPO4 was initially performed by the method of agar block (Ichikawa *et al.*, 1971) against *Candida albicans* (UFPEDA1007) starting from agar blocks of 6 mm in diameter containing *Streptomyces* sp. MPO4 cultures grown for 14 days at 30 °C in dish plates containing Sabouraud Glucose Agar (SDA) (20 g glucose, 5 g peptic digest of animal tissue, 5 g pancreatic digest of casein, 15 g agar, 1000 mL distilled water, pH 5.6) previously inoculated with the *Candida* suspension

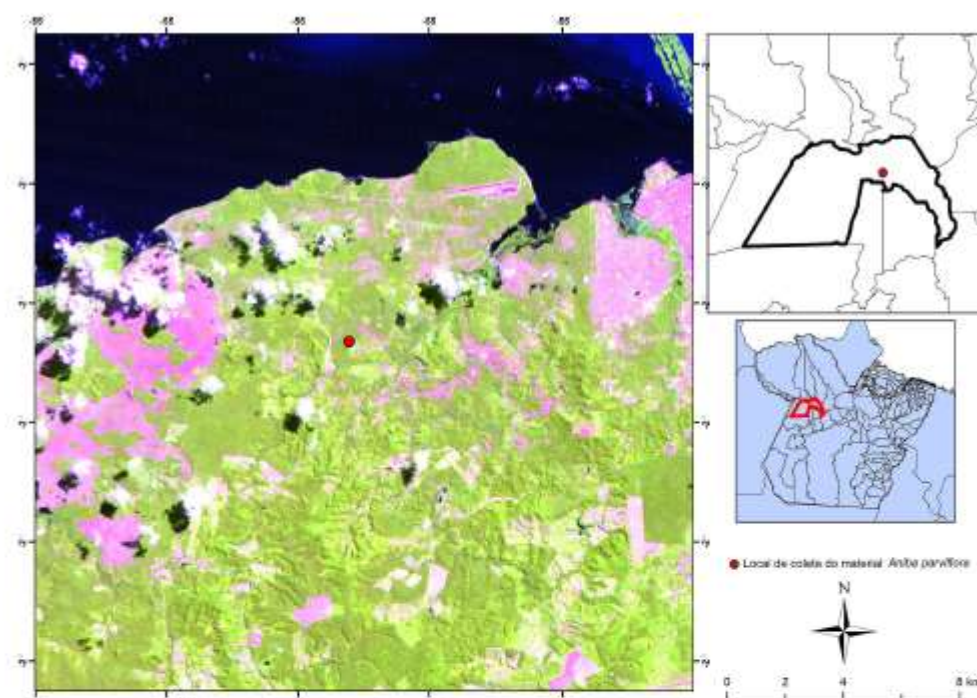


FIGURE 1 - Map of geographic coordinates of the soil sampling point rhizosphere of *Aniba parviflora* syn. *A. fragans* (Macacaporanga) (Latitude 20 28 '01.28 "S Longitude 54 0 49' 45.32').

adjusted to 0.5 McFarland. The plates were maintained at 30 °C and for 48 h to observe the inhibition halo.

It was adopted a completely randomized design with 4 replications. Data were subjected to analysis of variance and means compared by Tukey test with 5% of probability.

Intensity of the inhibitory activity was classified according to Sahin and Ugur (2003), and the size of the inhibition zone divided into four different groups: group ability-zone of inhibition less than 10 mm; slightly active group-inhibition zone between 11 and 20 mm; moderately active group-inhibition zone between 21.2 mm and 30 mm; and highly active group, whose zone of inhibition is greater than 31 mm.

Fermentation

After anti-*Candida*'s activity screening, was carried submerged fermentation in 250 mL erlenmeyer flask using the ISP2 medium from 50 mL of the pre-inoculum kept under stirring of 180 rpm (Magnetic stirrer Fisatom®

Mode 1751) for 48 h at room temperature (Braga *et al.*, 1967). An aliquot of 10% of the pre-inoculum was used for fermentation in ISP2 medium with 4% dextrose and ISP2 modified by removal of dextrose. The fermentation occurred both under agitation of 180 rpm for 168 h and without stirring. The anti-*Candida* activity, temperature, pH and weight of the biomass were monitored every 24 h (Braga *et al.*, 1967).

To evaluate the anti-*Candida* activity to every 24 h the fermented liquid was centrifuged (927 g, 10 minutes) to precipitate the biomass and 100 µL of the supernatant were used on the test by the diffusion method in wells (Thakur *et al.*, 2009) in Petri dishes containing Sabouraud Glucose Agar (SDA) previously inoculated with the *Candida albicans* suspension. The plates were incubated at 30 °C for 48 h and the antifungal activity was detected by the presence of zones of inhibition in millimeters. It was adopted a completely randomized design with 4 replications. Data were subjected to analysis of variance and means compared by Tukey test at 5% probability.

TABLE I - Mean values of halos of inhibition of *Candida albicans* growth compared to the different liquid fermented

Fermentation time	ISP2 With stirring	ISP2 Without stirring	ISP2 Modified With stirring	ISP2 Modified Without stirring
24 h	12.3 ± 0.58 ^{ab}	-	-	-
48 h	15.3 ± 0.58 ^{ab}	-	-	-
72 h	21.3 ± 0.58 ^{ac}	-	-	-
96 h	25.3 ± 0.58 ^{aa}	-	24.3 ± 0.58 ^{aa}	-
120 h	24 ± 1.73 ^{aaB}	-	23 ± 1 ^{aa}	-
144 h	23 ± 1 ^{ab}	-	19.3 ± 0.58 ^{ab}	-
168 h	19.3 ± 0.58 ^{ab}	-	13.3 ± 1 ^{bc}	-

Same letters are not statistically different by Tukey test ($p < 0.05$)

The quantification of wet biomass was done by centrifuging the fermented liquid (927 g, 20 min) in falcon cones with their weight previously measured. Subsequently, it was removed the supernatant and it was measured the weight of biomass that remained at the falcon cone.

Obtaining metabolites

The fermented liquid was filtered through cellulose acetate 0.22 µm porosity filter and the filtrate was subjected to extraction of secondary metabolites using ethyl acetate for 3 steps at a ratio (2:1) under mechanical stirring for 1 h at 180 rpm. The organic phase was concentrated on a rotary evaporator to obtain the crude extract.

RESULTS

The anti-*Candida* activity of fermented liquid in ISP2 medium varied according to fermentation time, showing growth inhibition zones of between 12.3 mm and 25.3 mm. These activities are therefore classified as moderately active and slightly active, respectively (Table I).

Inhibition zones were registered only in the metabolic liquid after a 24 h fermentation process. In 96 h, the production of anti-*Candida* metabolites was increased. The zones of inhibition for *Candida albicans* can be seen in Figure 2.

Stirring was a determining factor for the production of antifungal secondary metabolites, but was not significant for the production of biomass (Figure 3).

Carbon source was an important factor in the production of anti-*Candida* metabolites, and the presence of glucose optimizes the production of metabolites in shorter fermentation, with production of antifungal metabolites in the fermentation liquid in ISP2 modified stirring from 96 h fermentation. The carbon source influenced positively also in the production of biomass.

DISCUSSION

The ISP2 medium proved to be a good alternative for the generation of bioactive metabolites with antifungal activity by submerged fermentation (Cunha *et al.*, 2009). Analyzing the fermentation process in different culture media of endophytic strain *Streptomyces* sp. EBR-49 UFPEDA isolated from plant roots *Conyza bonariensis* (L.), it was observed that the largest zones of inhibition were against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 in ISP2 medium, concluding that this is the best medium for the production of bioactive compound for that lineage.

Also, it was evaluated the production of antimicrobial metabolites testing different culture medium for fermentation which achieved better inhibition halo from the fermented liquid 72 h at ISP2 with (4%) carbon source (glucose) and recorded growth inhibition zones 24.5 mm at 72 h of fermentation.

Carbon source and the aeration development of primary metabolism resulting in increased biomass and interferes with antibiotic production by the suppression of the biosynthetic enzymes (Muller *et al.*, 2007; Demain, Sanchez, 2009). In this study the carbon source interferes on late production of anti-*Candida* metabolites and stirring was a determinate factor of antibiotic metabolites production.

Therefore, the selection of culture media is essential during the process of production of antibiotics by microorganisms. Since, microbial growth this not directly related to the production of antimicrobial metabolites. Thus a microorganism can grow without producing metabolites with this property, thus resulting in a significant amount of biomass and allows yield of bioactive metabolites. Thakur *et al.* (2009) observed during fermentation of *Streptomyces* sp. 201 that the antimicrobial activity of the fermented liquid was not related to biomass amount.

Salamoni (2009) described the antimicrobial activity obtained from the fermentation of 25 species of

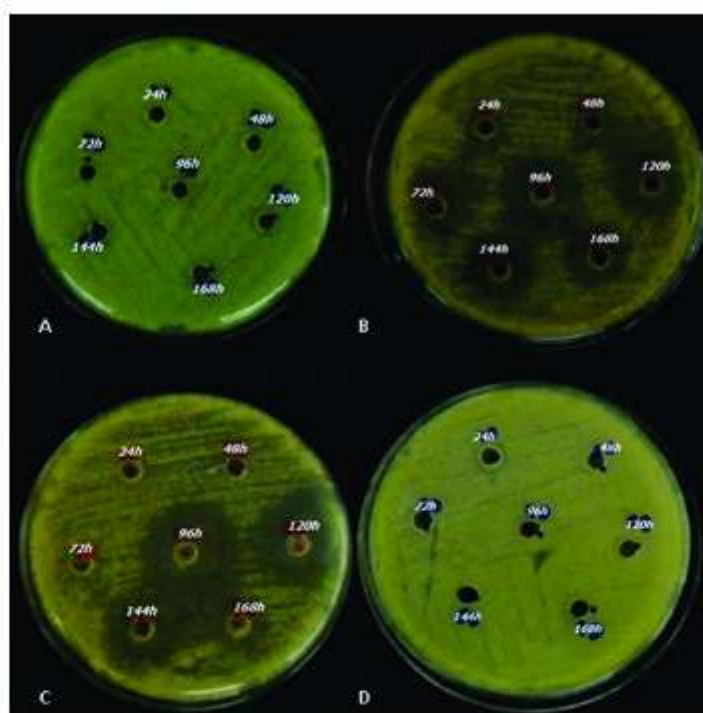


FIGURE 2 - Anti-*Candida* activity of fermented liquid *Streptomyces* sp. MPO-4 against *Candida albicans*. A) Fermented liquid ISP2 without stirring; B) Fermented liquid ISP2 with stirring; C) Fermented liquid ISP2 modified with stirring; D) Fermented liquid ISP2 modified without stirring.

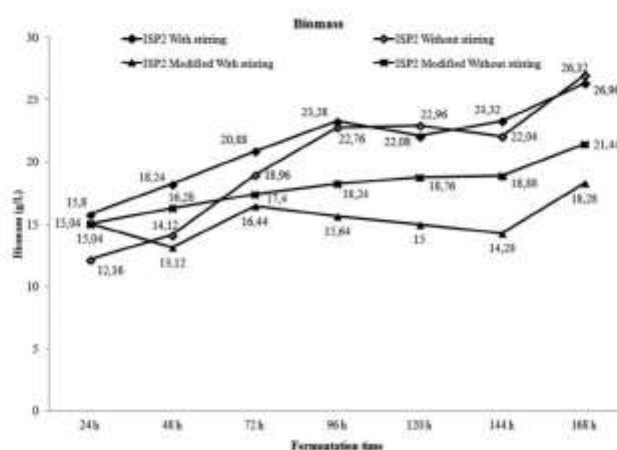


FIGURE 3 - Growth of biomass vs time in different fermentation conditions.

actinomycetes of the genus *Streptomyces* using mineral medium of casein and starch, and ISP2 medium, where 80% of the isolates were able to inhibit at least one of the tested bacteria. In another study, Salamoni, Van der Sand and Germani (2012) gave better yield of antimicrobial metabolites by the fermentation of *Streptomyces* sp. 1S on ISP2 medium at 28 °C by the 24 h of fermentation, by being active against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and even yeasts such as *Candida albicans* and filamentous fungi.

CONCLUSION

Streptomyces sp. MPO-4 isolated from the rhizosphere soil of *Aniba parviflora* Syn *A. fragans* (Macacaporanga) produces anti-*Candida* metabolites with increased activity in fermentation in ISP2 medium with glucose and stirring, having inhibition halos between 12.3 mm and 25.3 mm, yielding higher production of antifungal agents after 96 h. Stirring was a determining factor for the production of anti-*Candida* secondary metabolites, since the absence of glucose reflected in the late production of the anti-*Candida* metabolites.

Bioprospecting of microorganisms with biotechnological potential has enabled the use of bioactive compounds in several areas of knowledge, and the isolation of actinomycetes present in differentiated soil such as the Amazon as well as the elucidation of compounds bioactive, represent the primary goal for this research group, presenting this way, as a possibility of local scientific development generating immediate impact for the pharmaceutical, food industry, environmental and cosmetology, thereby resulting in social and economic development of the Amazon.

ACKNOWLEDGEMENTS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support.

REFERENCES

- ARUMUGAM, M.; MITRA, A.; JAISANKAR, P.; DASGUPTA, S.; SEN, T.; GACHHUI, R.; MUKHOPADHYAY, U. K.; MUKHERJEE, J. Isolation of an unusual metabolite 2-allyloxyphenol from a marine actinobacterium, its biological activities and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.86, n.1, p.109-117, Mar 2010.
- AVRELLA, D.; GOULART, L. S. G. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.40, n.3, p.205-207, 2008.
- BRAGA, A. S.; GABRIEL, S. J.; CARRAZZONI, E. P.; GOTTLIEB O. R.; Lyra, F. D. A. Ciclamina e ciclacina. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v.39, p. 253-254, 1967.
- CHEN, Y.; NTAI, I.; JU, K. S.; UNGER, M.; ZAMDBORG, L.; ROBINSON, S. J.; DOROGHAZI, J. R.; LABEDA, D. P.; METCALF, W. W.; KELLEHER, N. L. A proteomic survey of nonribosomal peptide and polyketide biosynthesis in actinobacteria. *J. Proteome Res.*, v.11, n.1, p.85-94, Jan 1, 2012.
- CUNHA, I. G. B. da; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. da S.; SILVA, R. E. A. da; AMORIM, E. L. C. de; ARAÚJO, J. M. de. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-AUFPEDA. *Rev. Bras. Farm.*, v.90, n.2, p.120-123, 2009.
- DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot. (Tokyo)*, v.62, n.1, p.5-16, 2009.
- EL-NAGGAR, N-A.; MOAWAD, H.; EL-SHWEIHY, N. M.; EL-EWASY, S. M. Optimization of culture conditions for production of the anti-leukemic glutaminase free L-asparaginase by newly isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 using response surface methodology. *Biomed. Res. Int.*, v.2015, p.627031, 2015.
- GILO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v.46, n.3, p.225-234, 2010.
- GONZÁLEZ, I.; AYUSO-SACIDO, A.; ANDERSON, A.; GENILLOU, O. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS microbiology ecology*, v.54, n.3, p.401-415, 2005.
- GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H. P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *A. Van Leeuwen. J. Microb.*, v.98, n.2, p.119-142, 2010.

- GUPTE, M. D.; KULKARNI, P. R. A study of antifungal antibiotic production by *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 using full factorial design. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.35, n.1, p.22-26, 2002.
- ICHIKAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol. (Praha)*, v.16, n.3, p.218-224, 1971.
- JØRGENSEN, H.; DEGNE, K. F.; DIKTY, A.; FJÆRVIK, E.; KLINKENBERG, G.; ZOTCHEV, S. B. Insights into the evolution of macrolactam biosynthesis through cloning and comparative analysis of the biosynthetic gene cluster for a novel macrocyclic lactam, ML-449. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.76, n.1, p.283-293, Jan 2010.
- KARUPPIAH, V.; AARTHI, C.; SIVAKUMAR, K.; KANNAN, L. Statistical optimization and anticancer activity of a red pigment isolated from *Streptomyces* sp. PM4. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, v.3, n.8, p.650-656, Aug 2013.
- KIM, B. Y.; ZUCCHI, T. D.; FIEDLER, H. P.; GOODFELLOW, M. *Streptomyces cockliensis* sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.62, pt.2, p.279-283, Feb 2012.
- KIM, E. J.; YANG, I.; YOON, Y. J. Developing *Streptomyces venezuelae* as a cell factory for the production of small molecules used in drug discovery. *Arch. Pharm. Res.*, v.38, n.9, p.1606-1616, Jul 28, 2015.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N. T. de. *Tratado de Micologia médica*. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.
- MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S. K. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol. Res.*, v.169, n.4, p.262-278, 2014.
- MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. da S.; LACERDA, L. L. V. de; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo Air-lift e shaker. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.27, n.4, p.688-693, 2007.
- NONOMURA, H.; OHARA, Y. Distribution of soil actinomycetes. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil. *J. Ferment. Technol.*, v.47, p.463-469, 1969.
- PRAKASH, D.; NAWANI, N.; PRAKASH, M.; BODAS, M.; MANDAL, A.; KHETMALAS, M.; KAPADNIS, B. Actinomycetes: a repository of green catalysts with a potential revenue resource. *Biomed. Res. Int.*, v.2013, 8p., ID 264020, 2013.
- RASHAD, F. M.; FATHY, H. M.; EL-ZAYAT, A. S.; ELGHONAIMY, A. M. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiol. Res.*, v.175, p.34-47, Jun 2015.
- SAHIN, N.; UGUR, A. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. *Turk. J. Biolog.*, v.27, p.79-82, 2003.
- SALAMONI, S. P. *Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de Streptomyces e estudo de produção de moléculas bioativas*. Porto Alegre, 2009. 141 p. Tese de doutorado - Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SALAMONI, S. P.; VAN DER SAND, S. T.; GERMANI, J. C. Estudo de produção de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp. 1S. *Evidência: Ciência e Biotecnologia*, v.12, n.2, p.175-186, 2012.
- SANCHEZ, C.; QUINTERO, J. C.; OCHOA, S. Flux balance analysis in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Prog.*, v.31, n.5, p.1226-1236, Jul 14, 2015.
- SHIN, H. J.; JEONG, H. S.; LEE, H. S.; PARK, S. K.; KIM, H. M.; KWON, H. J. Isolation and structure determination of streptochlorin, an antiproliferative agent from a marine-derived *Streptomyces* sp. 04DH110. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.17, n.8, p.1403-1406, Aug 2007.
- SHIRLING, E. B.; GOTTlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.16, n.3, p.313-340, 1966.

THAKUR, D.; BORA, T. C.; BORDOLOI, G. N.; MAZUMDAR, S. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *J. Mycol. Med.*, v. 19, n. 3, p. 161-167, 2009.

WILLIAMS, S.; SHARPE, M.; HOLT, J. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. V 4. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989.

Received for publication on 23rd January 2015

Accepted for publication on 12th April 2016

ANEXO U. Artigo aceito para publicação na African Journal of Microbiology Research.

ANTIFUNGAL SECONDARY METABOLITES FROM ACTINOBACTERIA OF AMAZONIAN SOIL

ABSTRACT

This study evaluated the antifungal potential of *Streptomyces* sp. MPO-4 isolated from the rhizosphere soil de *Aniba parviflora* *Syn fragans* (Macacaporanga) by Agar block technique. Secondary metabolites were obtained in the fermentation broth followed by solvent extraction with ethyl acetate, for further evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude extract against *Postia placenta*, *Rhizoctonia solani*, and the yeasts *Candida albicans* and *Candida krusei*. The *Streptomyces* sp. MPO-4 was active against *Rhizoctonia solani*, *C. albicans* and *C. krusei*. Antifungal metabolites were produced from the fermentation 24 hours front *Candida albicans*, and after 48 hours for *Candida krusei* and *Rhizoctonia solani*. The minimum fungicidal concentration for *Candida krusei* is 2000µg/mL, for *Candida albicans* is 1500µg/mL and 1200µg/mL for *R. solani*. Conclusion: In this study was revealed the production of bioactive compounds by *Streptomyces* sp. MPO-4 with antifungal activity against filamentous fungi and yeasts of clinical and environmental interest.

Key words: Antagonism, *Streptomyces* sp, Biological products, *Candida albicans*, *Candida krusei*.

INTRODUCTION

Over the last decades the frequency of systemic fungal infections has increased. New pathogens and the emergence of strains resistant to antifungal explain the increase in infections (Lass-Flörl, 2009). Extensive research has been developed in order to obtain new natural or synthetic drugs effective with low toxicity and high selectivity against strains of resistant microorganisms (Selmecki *et al.*, 2009).

The production of bioactive compounds derived from bacteria and fungi have been described since early the 20th century, and the actinobacteria has been the target of the biotechnology industry because they are considered an inexhaustible source of bioactive secondary metabolites with chemical structure extremely diverse and pharmacological action (Arasu *et al.*, 2009; Batista *et al.*, 2011).

Currently is estimated that about 20 to 60% of the natural origin antibiotics found are produced by soil microorganisms especially of the genus *Streptomyces* (Olano *et al.*, 2009; Adegboye *et al.*, 2012). In addition, these compounds are also described metabolites with anti-inflammatory, antitumor, antioxidants, antiviral, antiparasitic, anticoagulant, enzymes, vitamins and siderophores. It also produces aromatic compounds such as geosmin, responsible for produce odor similar to the wet earth (Arumugam *et al.*, 2010; Srividya *et al.*, 2012; Minotto, 2014).

The phylum Actinobacteria correspond a group of Gram-positive filamentous bacteria with a high Guanine and Cytosine (G+C) in their DNA content and establish a morphological relationship very close to fungi, producing of slender hyphae development comprising the vegetative mycelium the support substrate and aerial mycelium, which are found the propagating structures (Azuma, 2012).

These bacteria are cosmopolitan and can be found in various habitats, even the most inhospitable (Kumar *et al.*, 2010; Gulve and Deshmukh, 2011; Minotto, 2014). They are easily distinguished from other bacteria and fungi because it have macromorphological characteristics as the production of compact and dry colonies, resistant surface usually covered with aerial mycelium (Mohan and Charya, 2012).

In soil, Actinobacteria participate in fundamental biological processes such as the degradation of organic matter, because they are able to produce different enzymes such as hydrolases and proteases, which act on the organic matter decomposition process (Loqman *et al.*, 2009; Okoro *et al.*, 2009; Thakur *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010).

The use of ecology in the exploration of biotechnological interest microorganisms isolated from soil and medicinal plants became more frequent and has been shown the discovery of new bioactive metabolites (Thakur *et al.*, 2009; Mahajan and Balachandran, 2011). This study evaluate the antifungal potential of secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. MPO-4 isolated from Amazon soil against pathogens of clinical and environmental interest.

MATERIALS AND METHODS

Isolation, cultivation and maintenance of *Streptomyces* sp. (MPO-4)

The lineage of actinobacteria MPO-4 used in this study was isolated from rhizospheric soil of *Aniba parviflora* *Syn fragans* (Macacaporanga), collected in the transition zone between tropical rain forest and savanna near Santarem, Para, Brazil (2°28'S and 54°49'O) (Figure 1). Permission to conduct the study was issued by the Ministry of the

Environment - MMA, Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation - ICMBio by number 47530-1.



Figure 1. Map of the Brazil indicated the area where it was collected the rhizosphere soil sampling point of *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga). (2°28'S and 54°49'O) - Santarem, Para, Brazil, 2015.

Ten grams of soil were added into 90mL sterile distilled water and shaken for 30 min. *Streptomyces* sp. (MPO-4) was isolated using micro dilution technique. The soil sample (0.1 mL from the dilution) was spread over onto following media asparagine yeast agar (ALA) (Himedia) supplemented with Nistatina (64 µg / mL) to prevent the growth of fungi. The plates were incubated at 30°C for 21 days. *Streptomyces* sp. (MPO-4) was subcultured on ALA and International Streptomyces Project Agar (ISP2)(Pridham *et al.*, 1956) until pure culture was obtained. The pure culture was stored by mineral oil technique.

Morphological, physiological and biochemical characteristics

The pure lineage of actinobacteria MPO-4 grown on ISP2 broth at 30°C for 3 days and after *Streptomyces* sp. (MPO-4) culture was taken in a sterile glass slide and heated gently over flame. The method of Gram was used to confirm the morphological characteristics of the microorganisms. The results observed were Gram positive organism.

Morphological, physiological and biochemical properties were determined based on standard methods. The International *Streptomyces* Project (ISP) used as following ISP medium 1, ISP medium 2, ISP medium 3, ISP medium 4, ISP medium 5 to determine the Aerial mass color and soluble pigments, and ISP medium 9 was used to determine utilization of carbon source as recommended by (Shirling and Gottlieb, 1966). Utilization of nitrogen source, degradation of starch, gelatin and casein were done according to (Williams *et al.*, 1989) and sensitivity to antibiotics was carried out as describe by Petrova and Vlahov (2007). Ability to grow at different NaCl concentrations were done using ISP medium 2.

Molecular identification

The 16S rRNA gene (767 bp, partial sequence) from lineage of actinobacteria MPO-4 were analyzed after DNA extraction by (Stirling, 2003). The PCR method used was 1 pair of primers [Eub338 Forward (5'- ACTCCTACGGGAGGCAGCAG -3') / Act1159 Reverse (5'- TCCGAGTTRACCCCGGC -3)] (Fierer *et al.*, 2005).

The PCR cycle included following: (1) an initial denaturation step for 3 min at 95 °C; (2) 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s annealing in 68 °C and 90 s in 72 °C, and extension of 7 min at 72 °C.

The PCR product was purified using the GFX kit (GE Healthcare 28-9034-70) and subcloned into the vector pCRTM2.1-TOPO® vector using the TOPO TA Cloning kit (ThermoFisher Scientific 451 641). The cloned plasmid was propagated in *E. coli* DH5- α and purified using the kit (Fermentas K0503).

For sequencing, the following primers were used: M13F primer (GTAAAACGACGGCCAGT) and M13R (AACAGCTATGACCATG) for all fragments subcloned in pCRTM2.1-TOPO® vector.

For the complete sequencing 16S rRNA were used oligonucleotides (Lane D. J 1991) 341-357F (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704f (GTAGSGGTGAAATACGTAGA) and 1099-1114f (GCAACGAGCGCAACCC). The Sanger sequencing was performed using ABI PRISM 3730 DNA ANALYZER, Applied Biosystems / Hitachi in Genomics Laboratory and transposable elements (GaTE) the Biosciences Institute at the University of São Paulo (<http://gate.ib.usp.br/GateWeb-new/>).

The sequences were analyzed with the software. CLC Main Workbench version 7.0 The noted *contigs* were compared against the BLAST database accessed on 20 December 2015.

Microorganism test

The plant pathogens used in the test were kindly provided by Biodegradation and Preservation of Wood Laboratory Laboratory (UFES) and Phytopathology Laboratory of Biodiversity and Forests Institute (UFOPA). The yeast of clinical interest were provided by the Department of Antibiotics (UFPE). Microorganisms aim of this study were filamentous fungi *Rhizoctonia solani*, *Polyporus sanguineus*, *Postia placenta* and yeast *Candida albicans* of clinical interest (UFPEDA1007) and *Candida krusei* (UFPEDA1002). The test microorganisms were maintained on Sabouraud Dextrose Agar at 30°C until the preparation of the fungal suspension used in the tests.

The lineage of actinobacteria MPO-4 was grown in ISP2 medium (Shirling and Gottlieb, 1966) in the Petri dish (95x15mm diameter) incubated at 30°C for 168 h to observe its sporulation and complete colonization of the surface of the culture medium. The test microorganisms were maintained on Sabouraud Dextrose Agar at 30°C until the preparation of the fungal suspension used in the tests.

Antagonistic activity

To investigate the antifungal potential of the lineage of actinobacteria MPO-4 was performed a primary antagonism test against fungi through the agar block technique (Ichikawa *et al.*, 1971) and was further performed secondary test for the production of antifungal compounds by submerged fermentation in a liquid medium ISP2 stirring for 5 days.

For the Agar test block were cut circular blocks 6mm diameter containing colonies of lineage of actinobacteria MPO-4 grown for 168 h in ISP2 medium and disposed on Petri plates (95x15mm diameter) containing Sabouraud Dextrose Agar (SDA) previously inoculated with 100 μ l of fungal suspensions adjusted to 0.5 on the MacFarland scale.

The blocks were positioned equidistant 25mm thus providing better visualization of the possible inhibition halos. The production of biocompounds with antifungal activity was observed by the formation of clear zones of inhibition of fungal growth and expressed in millimeters (mm). The intensity of the inhibitory activity was classified being the size of the inhibition zone divided into four different groups: group passive - zone of inhibition less than 10 mm; slightly active group - inhibition zone between 11 and 20 mm; moderately active group - inhibition zone between 21 mm and 30 mm; and highly active group, whose zone of inhibition is greater than 31mm (Brown *et al.*, 1976).

The test was done in triplicate and the plates were incubated at 32°C for 48h. The data were submitted to analysis of variance and means compared by Tukey test ($p > 0,05$).

Obtaining the antifungal metabolites

For the production of antifungal metabolites was used ISP-2 medium (4 g yeast extract, 10 g malt extract, 4g dextrose, 1000 mL distilled water, pH 7,0) (Pridham *et al.*, 1956). For the inoculum were prepared with 50 mL of ISP-2 culture medium and three blocks of 6mm diameter with culture by lineage of actinobacteria MPO-4 on a shaker (180 rpm) at 30°C for 48h. Then 10% of the volume was transferred to 250 mL of ISP2 culture medium under the same conditions for five days.

To evaluate the antifungal activity every 24 h the fermented liquid was centrifuged (927 x g, 10 minutes) for the separation of biomass and the supernatant was removed aliquot for testing by wells diffusion method (Şahin and Uğur, 2003). The test was done in triplicate and the plates were incubated at 32°C for 48h. The data were submitted to analysis of variance and means compared by Tukey test ($p > 0,05$).

Antibiotic extraction

After fermentation at 120 h the liquid was filtered through cellulose acetate membrane filter with porosity 0.22 µm, and the filtered product was subjected to extraction of the secondary metabolites using the organic solvent ethyl acetate in the ratio 2:1 (v:v) of the fermented liquid, followed by agitation at 180rpm for 1 hour allowing separation into two distinct liquid phases, the aqueous phase and organic phase. This process was performed twice using only 100 mL of the solvent in each extraction step, followed by agitation at 180rpm for 30 and 15 minutes, respectively. The organic phase of all extraction steps was concentrated on a rotary evaporator to obtain the crude extract.

Evaluation of minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude extract of actinobacteria lineage MPO-4

The crude extract of fermentation was used to determine the minimum inhibitory concentration by the microdilution technique (Wikler, 2006). The following concentrations were tested: 2500µg / mL, 2000µg / mL, 1500µg / mL, 1000µg / mL and 500 µg / mL.

RESULTS AND DISCUSSION

The actinobacteria lineage MPO-4 was a filamentous gram-positive actinobacteria, and the cultural characteristic showed grew on diferente media (ISP1, ISP2 and ALA), it

formed yellow and whitish color mycellium and on the reverse side it showed yellow, without production of diffusible pigment (Figure 2). (Table 1).

Table 1. Culture characteristics of actinobacteria lineage MPO-4 on diferente media.

Medium	Growth	Substrate mycelium	Aerial mycelium	Reverse	Pigment
ISP-1	Moderate	Presente	White	Yellowish	-
ISP-2	Good	Presente	White	Yellowish	-
ISP-3	Moderate	Presente	White	Yellowish	-
ISP-4	-	-	-	-	-
ISP-5	-	-	-	-	-
ALA	Moderate	Presente	White	Yellowish	-

+, presente; -, absent.



Figure 2. The growth of actinobacteria lineage MPO-4 on ISP-2 medium.

The results of physiological and biochemical properties revealed that the actinobacteria lineage MPO-4 grew at 30°C and growth at 5% NaCl concentration. The obtained results (Table 2).

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of *Streptomyces* sp. (MPO-4).

Characteristics	Results
Gram	Positive
Production of diffusible pigment	-

Growth in the presence of NaCl	3-7%
H ₂ S production	-
Amylase	+
Protease	+
Gelatinase	+
<i>Utilization of carbon sources</i>	
None carbon source (- control)	-
Celulose	+
D-Manose	+
D-Fructose	+
D-Glucose (+ control)	+
D-Inositol	+
D-Lactose	+
D-Manitol	+
D-Melezitose	-
D-Rhamnose	+
D-Sacarose	+
D-Sorbitol	-
D-Trealose	-
D-Xylose	-
<i>Utilization of nitrogen sources</i>	
L-Arginin	++
L-Asparagin	++
L-Cysteine	++
L-Phenylalanine	++
L-Histidine	++
L- Glutamine	++
L-Methionine	++
L-Ornithine	++
L-Serine	++
L-Tyrosine	+
L-Threonine	++
L-Valine	++
<i>Standard antibiotics</i>	
Gentamicin 10 µg	S
Ampicilin 10 µg	R
Tetracycline 30 µg	S
Penicillin 10 µg	R
Chloramphenicol 30 µg	S
Neomycin 10 µg	S
Clindamycin 10 µg	R
Nitrofurantoin 300 µg	R

The sequence result of 16S rRNA gene of actinobacteria lineage MPO-4 revealed a partial sequence 767 bp were obtained (Figure 3). The sequence was submitted to GenBank

with accession number (KR063215.1) and indicates that corresponding *Streptomyces cinereus*, with 99% of similarity.

Figure 3. 16S ribosomal RNA gene sequence of the *Streptomyces* sp. MPO-4.

```
CGAAATCTTTACCCCGAAGGCATGCTGGCACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACT
TAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAA
GGGGGACACTGTCTCCAGTGTTTTCCGGTGATGTCAAGCCTTGGTAAGCATCTTCGCGTTGC
GTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTCGGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGC
CTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACGACGTGG
AATGTCGCCCACACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGGAATACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
GCTCCCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGT
GTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTC
TAGCCTGCCCCTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGCGAC
AAGCCGCCTACGAGCTCTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTCGCGCCCTACGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCTTC
CCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCTGCTGCATCAGG
CTTCGCCCCAGGCAATG
```

During the antagonism test the actinobacteria was active against most pathogens, except *Postia placenta*. The most antagonistic activity was observed for *Candida albicans* in 96 h. It was observed that the antagonistic activity was increasing over time for assays with yeast and filamentous fungi for decreasing (Table 3).

Table 3. Antifungal activity by Agar Block Method.

Time (h)	Average Diameter (mm) of inhibition zones		
	Microorganisms		
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Candia albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
24h	10.3 ± 0.58 ^{bA}	12.3 ± 0.58 ^{aB}	13.3 ± 0.58 ^{aA}
48h	9.3 ± 0.58 ^{bAB}	12.7 ± 0.58 ^{aB}	13.7 ± 1.15 ^{aA}
72h	8.7 ± 1.15 ^{bB}	12.7 ± 0.58 ^{aB}	13.7 ± 1.15 ^{aA}
96h	8.3 ± 0.58 ^{cB}	15.7 ± 0.58 ^{aA}	14.0 ± 1.00 ^{bA}

Same letters are not statistically different by Tukey test (p < 0.05).

The best time of production of antifungal metabolites was 96 h, and *C. albicans* and *C. krusei* was the more sensitive microorganism, showing a high intensity of antimicrobial by the fermented liquid (Table 4).

Table 4. Antifungal activity of the fermented liquid by Well Diffusion Method.

Time (h)	Average Diameter (mm) of inhibition zones of fermented liquid		
	Microorganisms		
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Candia albicans</i>	<i>Candida krusei</i>

24h	10.6 ± 0.58 ^{Bc}	12.6 ± 0.58 ^{aF}	0 ^{cD}
48h	11.0 ± 1.00 ^{bBC}	15.3 ± 0.58 ^{aE}	12.0 ± 0 ^{bC}
72h	11.0 ± 0 ^{cBC}	22.0 ± 0 ^{aC}	15.0 ± 0 ^{bB}
96h	13.0 ± 0 ^{cA}	25.3 ± 0.58 ^{aA}	17.3 ± 0.58 ^{bA}
120h	12.3 ± 0.58 ^{cAB}	24.0 ± 1.73 ^{aAB}	16.0 ± 0 ^{Bab}

Same letters are not statistically different by Tukey test (p <0.05) probability.

The minimum fungicidal concentration for *Candida krusei* was 2000 µg/ mL for *Candida albicans* 1500µg /mL and 1200µg/mL for *R. solani*.

The genus *Streptomyces* sp. produces several bioactive secondary metabolites, especially antibiotic, which confers selective advantage during colonization of certain natural substrates where there is competition with fungi and bacteria (Polyanskaya *et al.*, 2003; Hamid, 2011), and due to this fact, promote biocontrol in competition situation against another organisms especially in the rhizosphere (Prabavathy *et al.*, 2006).

The antagonistic potential of actinobacteria from the genus *Streptomyces* sp. has been shown in several studies revealing a great potential of these bacteria to produce bioactive metabolites with antifungal activity (Polyanskaya *et al.*, 2003; Minotto, 2014). The antimicrobial action shows the production of antibiotics with a broad-spectrum of activity against Gram-positive and Gram negative (Meklat *et al.*, 2011). Studies show that actinobacteria metabolites produced by the genus *Nocardiopsis* are active against filamentous fungi and yeast, including *Candida albicans* and *Candida krusei* (Minotto, 2014).

This study revealed the production of bioactive compounds by *Streptomyces* sp. MPO-4 with antifungal activity against filamentous fungi and yeast of clinical and environmental interest.

REFERENCES

- ADEGBOYE, M. F. *et al.* Analysis of *Streptomyces* spp. Native to Mahikeng Soils in South Africa. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 1001-1010, Sep 2012. ISSN 0973-7510. Available at: <<Go to ISI>://WOS:000312050400002 >.
- ARASU, M. V. *et al.* In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2009. ISSN 1156-5233.
- ARUMUGAM, M. *et al.* Isolation of an unusual metabolite 2-allyloxyphenol from a marine actinobacterium, its biological activities and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 86, n. 1, p. 109-17, Mar 2010. ISSN 0175-7598.

AZUMA, M. V. P. Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da Região Entre-Marés da Ilha do Mέλ, PR, Brasil. 2012.

BATISTA, W. B. et al. Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de diferentes cultivares. **Unimontes Científica**, v. 12, n. 1/2, p. pág 60-68, 2011. ISSN 2236-5257.

BROWN, A. G. et al. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 29, n. 6, p. 668-9, Jun 1976. ISSN 0021-8820 (Print)

FIERER, N. et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 7, p. 4117-20, Jul 2005. ISSN 0099-2240 (Print)

GULVE, R.; DESHMUKH, A. Enzymatic activity of actinomycetes isolated from marine sediments. **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 5, p. 80-83, 2011.

HAMID, M. E. Variable antibiotic susceptibility patterns among *Streptomyces* species causing actinomycetoma in man and animals. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, p. 5, 2011. ISSN 1476-0711. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000208655000024 >.

ICHIKAWA, T. et al. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 16, n. 3, p. 218-24, 1971. ISSN 0015-5632 (Print)

KUMAR, N. et al. Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. **Int J Microbiol Res**, v. 2, n. 2, p. 12-16, 2010.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 197-205, 2009. ISSN 1439-0507.

LOQMAN, S. et al. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 81-91, 2009. ISSN 0959-3993.

MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, p. 240-253, 2011. ISSN 1945-0494.

MEKLAT, A. et al. Isolation, Taxonomy, and Antagonistic Properties of Halophilic Actinomycetes in Saharan Soils of Algeria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6710-6714, Sep 2011. ISSN 0099-2240. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000294691400051 >.

MINOTTO, E. Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. 2014.

MOHAN, G. M.; CHARYA, S. Enzymatic activity of fresh water actinomycetes. **International Research Journal of Pharmacy**, p. 3-11, 2012.

OKORO, C. K. et al. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 95, n. 2, p. 121-133, 2009. ISSN 0003-6072.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Antitumor compounds from marine actinomycetes. **Marine drugs**, v. 7, n. 2, p. 210-248, 2009.

POLYANSKAYA, L. et al. The Abundance and Structure of the Root-Associated Microbial Complexes of Two Greenhouse Rose Cultivars. **Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 496-502, 2003. ISSN 0026-2617.

PRABAVATHY, V. R.; MATHIVANAN, N.; MURUGESAN, K. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. **Biological Control**, v. 39, n. 3, p. 313-319, 2006. ISSN 1049-9644.

PRIDHAM, T. G. et al. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiot Annu**, p. 947-53, 1956. ISSN 0570-3131 (Print)

SELMECKI, A. M. et al. Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. **PLoS genetics**, v. 5, n. 10, p. e1000705, 2009. ISSN 1553-7404.

SHIRLING, E. T.; GOTTLIEB, D. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst.*, 1966, Citeaser.

SRIVIDYA, S. et al. *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. **Eur. J. Exp. Biol**, v. 2, n. 1, p. 163-173, 2012.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. **Methods Mol Biol**, v. 226, p. 53-4, 2003. ISSN 1064-3745 (Print)

THAKUR, D. et al. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 19, n. 3, p. 161-167, 2009. ISSN 1156-5233.

WIKLER, M. A. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement.** Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. ISBN 1562385887.

WILLIAMS, S.; SHARPE, M.; HOLT, J. **Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 4. Williams and Wilkins, London.** ISBN 0-68309-061-5. 1989

ŞAHİN, N.; UĞUR, A. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. **Turkish Journal of Biology**, v. 27, n. 2, p. 79-84, 2003. ISSN 1300-0152.

ANEXO V. Artigo submetido para publicação na revista Scientia Plena.



SCIENTIA PLENA
www.scientiaplenu.org.br

VOL. X, NUM. X

20XX

doi: 10.14808/sci.plena.20XX.XXXXXXX

Prospecção de enzimas de interesse industrial produzidas por actinobactéria isolado de solo rizosférico da Amazônia

Prospection of enzymes of industrial interest produced by actinomycete isolated from rhizospheric soil of the Amazon

S. M. de Oliveira¹, D. F. da Silva¹, I. N. dos Santos¹, C. V. P. Corrêa¹, T. C. de F. Liberal¹, F. L. C. Branco¹, C. N. J. Colares¹, S.K.S Escher^{1,2,3}, J. K. Ishida⁴, T. S. Mui⁴, J. M. de Araújo², E. L. C. de Amorim²

¹Instituto de Saúde Coletiva/Laboratório de Microbiologia/Universidade Federal do Oeste do Pará, CEP 68035-100, Santarém-Pará, Brasil.

²Departamento de Antibióticos/Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-901, Recife-Pernambuco, Brasil.

³Departamento de Ciências Farmacêuticas/Laboratório de Produtos Naturais/ Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-901, Recife-Pernambuco, Brasil.

⁴CENA-USP, Centro de Energia Nuclear e Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

[*katrineescher@hotmail.com](mailto:katrineescher@hotmail.com)

(Recebido em dia de mes de ano; aceito em dia de mes de ano)

Enzimas produzidas por micro-organismos tem despertado o interesse da indústria biotecnológica por sua vasta possibilidade de aplicação em diversos processos industriais devido sua estabilidade térmica e química. As actinobactérias são reconhecidas pelo seu potencial na produção de diversos metabólitos bioativos de estrutura química e ação biológica diversificados. Neste estudo foi isolado uma linhagem de actinobactéria rizosférica, caracterizada através de morfologia e métodos moleculares e avaliado o potencial enzimático através da produção de enzimas de interesse industrial. A linhagem de actinobactérias corresponde ao gênero *Microbacterium xylaniluticum* e apresenta alto potencial de produção de enzimas de interesse para a indústria de alimentos como lipases (IE=3,4), pectinases (IE=2,2) e esterases (IE=2,0), além da produção de hemolisina e L-glutaminase que apresenta propriedades anti-tumoral.

Palavras-chave: *Microbacterium xylaniluticum*, Enzimas extracelulares, Amazônia.

Enzymes produced by microorganisms has aroused the interest of the biotechnology industry for its wide potential application in many industrial processes because of its thermal and chemical stability. The actinomycetes are recognized for their potential in the production of various bioactive metabolites of diverse chemical structure and biological activity. In this study we isolated a strain of rhizospheric actinobacteria, characterized by morphology and molecular methods and rated the enzyme potential through the production of enzymes of industrial interest. The strain of actinomycetes corresponds to the genus *Microbacterium xylaniluticum* and has a high potential for production of enzymes of interest to the food industry as lipases (IE = 3.4), pectinase (IE = 2.2) and esterase (IE = 2.0), and the production of hemolysin and L-glutaminase that exhibits anti-tumor properties.

Keywords: *Microbacterium xylaniluticum*, extracellular enzymes, Amazon.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos bioativos podem ser obtidos através do metabolismo secundário de diversos micro-organismos, incluindo fungos e bactérias, onde se destacam o grupo das actinobactérias, grupo diversificado de bactérias gram-positivas com alto teor de Guanina e Citosina em sua estrutura de DNA, com ampla capacidade em produzir metabólitos secundários ativos como inseticidas, antitumorais, antibióticos, vitaminas e enzimas de interesse biotecnológico utilizadas na indústrias alimentícia, detergente, têxteis, papel e celulose como L-glutaminase, xilanases, lipases, celulasas, pectinases, proteases, amilases e quitinases [1-4]. Estas bactérias apresentam morfologia semelhante a fungos, pois se desenvolvem em forma filamentosa, possuindo micélio com hifas ramificadas no seu crescimento vegetativo [5]. Uma característica marcante deste grupo é a versatilidade metabólica, podendo se desenvolver em temperaturas elevadas e sobreviver a ambientes hostis, o que possibilita a sua ampla distribuição nos diversos ecossistemas [6].

A maioria das actinobactérias são aeróbias, heterotróficas e habitam naturalmente no solo. Adaptam-se às diversas condições do ambiente, produzem diversos metabólitos secundários e são capazes de colonizar a rizosfera e tecidos internos das plantas. Este grupo de bactérias é mais abundante em solos secos e quentes, e raros em solos turfosos e encharcados. As actinobactérias são saprófitas, porém algumas espécies são patogênicas ao homem, a animais ou plantas. No solo estas bactérias realizam funções importantes no processo de ciclagem de nutrientes, degradando compostos complexos de difícil decomposição como lignocelulose, lignina, celulose e outros materiais recalcitrantes, devido à sua capacidade em produzir diversas enzimas hidrolíticas e lipolíticas. Atuam também na fixação de nitrogênio dentro das raízes de plantas lenhosas não leguminosas, como ocorre no gênero *Frankia* [7].

Neste estudo foi avaliado a produção de enzimas de interesse industrial por uma linhagem de actinobactéria do gênero *Microbacterium* sp. isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga), planta nativa da Amazônia muito utilizada localmente por apresentar propriedades terapêuticas e aromáticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A cepa de *Microbacterium* sp. MPO6 utilizada no presente estudo foi obtida a partir de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga), coletado em zona de transição entre Floresta Densa e uma área com características de cerrado (Latitude 2° 28' 01.28"S de Longitude 54° 49' 45.32"O) no município de Santarém – PA.

Para isolamento da linhagem de actinobactérias foram coletadas 10g de solo rizosférico da planta e feito diluições seriadas em tampão fosfato (PBS) pH 7,2, para a obtenção das diluições 10^{-1} a 10^{-5} . O isolamento em placa foi realizado a partir da semeadura de uma alíquota de 100µL da diluição 10^{-4} em placas de Petri (15mmx90mm) contendo o meio Arginina Levedura Ágar (ALA) [8] acrescido de Nistatina (100µg/mL), e cultivo a 37°C durante 14 dias.

Foram determinadas as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da linhagem de actinobactéria isolada previamente tomando como parâmetro o aspecto rígido da colônia sobre o meio de cultura e a formação de micélio aéreo velutino. A linhagem foi cultivada nos meios ISP – International *Streptomyces* Project [9-11] para determinação da cor do micélio aéreo e vegetativo e a produção de pigmentos.

A identificação da actinobactérias foi realizada através de métodos clássicos e moleculares, sendo que a morfologia foi determinada a partir do microcultivo em meio ISP-2 [10, 12] e posteriormente análise microscópica por microscopia óptica de luz comum com aumento de 400x, e a identificação molecular foi realizado a partir de extração do DNA bacteriano conforme descrito por [13] a partir de 5 ml de suspensão celular em caldo ISP-2. Para a reação de amplificação foram utilizados os pares de

oligonucleotídeos Eub338F/Act1159R: 95°C (3'); 35 ciclos de 94°C (30''), 68°C (30''), 72°C (90''); extensão de 72°C (7'). O produto da PCR foi purificado utilizando o kit GFX (GE Healthcare 28-9034-70) e subclonado no vetor pCRTM2.1-TOPO® vector utilizando o kit TOPO TA Cloning (ThermoFisherScientific 451641). Para o sequenciamento foi utilizado os primers M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) e M13R (AACAGCTATGACCATG) para os fragmentos subclonados no vetor pCRTM2.1-TOPO®. Para o completo sequenciamento do 16S rRNA foram utilizados os oligonucleotídeos [14] 341-357F (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704f (GTAGSGGTGAAATACGTAGA) e 1099-1114f (GCAACGAGCGCAACCC). O sequenciamento Sanger foi realizado ABI PRISM 3730 DNA ANALYZER, AppliedBiosystems/Hitashi no Laboratório de Genômica e Elementos de Transposição (GaTE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (<http://gate.ib.usp.br/GateWeb-new/>).

A prospecção de enzimas de interesse industrial foi realizada em meio sólido em placas de Petri contendo o respectivo substrato inductor. A produção de lipase e esterase foi determinada segundo [15], em meio mineral contendo Tween 80 e Tween 20. As placas foram incubadas a 30°C por 10 dias e o aparecimento um halo branco difuso contendo oleato de cálcio indicou a produção das enzimas.

A produção de amilase foi determinada conforme descrito por [16] modificado a partir do cultivo em meio Ágar-amido à 30°C por 10 dias. O teste foi revelado com 10 mL de solução de lugol 1% e a descoloração do meio em torno da colônia evidenciou a hidrólise do amido.

A atividade proteolítica foi avaliada a utilizando os substrates caseína e gelatina. A degradação da caseína foi determinada em meio à base de Solução 1 (10g leite desnatado, 90mL Água destilada) e Solução 2 (3g Ágar, 97mL Água destilada) mantidos à 30°C por 7 dias. A formação de uma zona clara ao redor da colônia indicou a produção da enzima. A degradação da gelatina foi avaliada em meio de nutriente contendo 12% de gelatina, 0,5% de peptona e 0,3% de extrato de carne, 5g Peptona, 1000mL Água destilada à 30°C durante 20 dias. A manutenção da consistência líquida após incubação à 4°C por 24h indicou a produção de gelatinase.

A produção de pectinase foi avaliada após o cultivo em ágar TSA (1,5 g tripton, 0,5 g peptona de soja, 1,5 g NaCl, 1,5 g de ágar, pH 7,3) suplementado com 1% de pectina cítrica, à 25°C e 30°C por 7 dias. O aparecimento de halo transparente em volta das colônias, após a adição de 10 ml de solução de lugol 1% indicou a hidrólise da pectina.

A atividade hemolítica foi analisada após cultivo em meio Ágar Sangue suplementado com 5% de sangue desfibrinado e incubadas à 30°C por 7 dias. A presença de um halo claro ao redor das colônias indicou a produção da enzima.

A produção da enzima L-glutaminase foi avaliada segundo [4] após cultivo em ágar glutamina. As placas foram incubadas à 28°C por 7 dias e a produção da enzima foi indicada através da variação e intensidade da cor amarelo para rosa.

A determinação do índice enzimático (IE) foi realizada pela relação: $IE = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro da colônia} + \text{halo}} \times 100$, sendo considerado com potencial enzimático aquelas que apresentaram índice enzimático acima de 1,5.

Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o software Assistat 7.7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A actinobactéria isolada apresentou melhor crescimento nos meios ISP-1 e ISP-2, com desenvolvimento de colônias ásperas convexas, circulares, com borda irregular (Figura 1). A coloração do micélio aéreo formado foi predominantemente branco tornando-se rosa claro após 168h

no meio ISP-2. A actinobactéria produz pigmento solúvel no meio ISP2 após 120h, modificando o meio para cor âmbar (Tabela 1).



Figura 1: Morfologia das colônias de *Microbacterium xylanilyticum* apresentando formação do micélio aéreo velutino branco após 167h de cultivo em meio ISP-2.

Tabela 1 - Aspectos Macroscópicos da actinobactéria cultivadas em diferentes meios de cultura.

Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo	Pigmento difuso
ISP1	++	Branco	Amarelo	-
ISP2	++	Branco	Amarelo escuro	+
ISP3	-	-	-	-
ISP4	-	-	-	-
ISP5	+	Branco	Amarelo	-

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo.

Na micromorfologia foi observado cadeias de esporos simples espiraladas, características do filo Actinobacteria, e o sequenciamento de 821 pb, contendo 56,03% de G+C, foi compatível, com 99% de similaridade com o filo Actinobacteria, gênero *Microbacterium xylanilyticum*.

O *Microbacterium* sp. produz as enzimas lipase, esterase, pectinase, amilase, hemolisina, gelatinase e L-glutaminase, apresentando maior potencial enzimático para lipase (IE=3,4), seguido de pectinase (IE=2,2) e esterase (IE=2,0) (Tabela 2).

Tabela 2. Análise qualitativa da produção de enzimas produzidas por *Microbacterium xylanilyticum*.

Enzimas	Diâmetro da colônia (mm)	Halo enzimático (mm)	Índice Enzimático (mm)
Lipase	12,6 ±1,26	42,5±4,33	3,4
Esterase	17,7±8,15	35,0±0,00	2,0
Amilase	23±9,61	30,3±3,79	1,3
Pectinase	16,6±2,84	37,5±7,50	2,2
Hemolisina	9,1±0,76	11,2±0,76	1,2
Caseinase	-	-	-
Gelatinase		+	
L-glutaminase		+	

– ausente.

O filo Actinobactéria produz uma diversidade de enzimas como estratégia para a obtenção de fontes de carbono e nitrogênio [17]. A prospecção de enzimas hidrolíticas como lipases, amilases e proteases são uma alternativa viável para o tratamento de esgotos e efluentes indústrias de doces, sorvetes, laticínios e carnes, uma vez que para este fim não é necessário purificação, diminuindo, portanto os custos de aplicação [18].

As pectinases são enzimas líticas que hidrolisam compostos pécticos. São produzidas por fungos, bactérias e vegetais [19] e tem ação enzimática nos tecidos vegetais a nível de lamela média onde estão presentes compostos pécticos como pectato de cálcio e pectato de magnésio [20]. Estas enzimas líticas são ativas no processo de compostagem, a partir da degradação de matéria orgânica, contribuindo para o ciclo natural do carbono [21, 22]. As pectinases têm atraído a atenção por sua aplicação biotecnológica como catalisador biológico em diversos processos industriais, com grande aplicação na indústria alimentícia para a fabricação de sucos [23] e na produção de vinho como clarificador e estabilizador de cor do vinho tinto [24].

A enzima L-glutaminase (E.C. 3.5.1.2) apresenta atividade antitumoral, especialmente contra leucemia linfocítica aguda (LLA) [25, 26] e atividade antiviral contra HIV [27, 28]. É também utilizada na indústria de alimentos, tendo sua aplicação na intensificação de sabor, uma vez que aumenta o teor de Ácido glutâmico nos alimentos em decorrência da hidrólise da glutamina.

Poucos estudos relatam a produção de enzimas pelo gênero *Microbacterium* sp., especialmente de espécies isoladas do solo. Kim *et al.* (2005) [29] descreveu pela primeira vez cepas de *Microbacterium xylanilyticum* presentes em biofilme de um reator de membrana utilizado para tratamento de águas residuais, sendo determinadas apenas a produção das enzimas amilase e xylanase. A espécie *M. xylanilyticum* se diferencia de outras espécies como *Microbacterium soli* por produzir as enzimas esterase, lipase e gelatinase [30].

4. CONCLUSÃO

A actinobactéria *Microbacterium xylanilyticum* isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga) produz enzimas extracelulares de interesse industrial, sendo descritos neste estudo a produção de enzimas hidrolíticas, lipolíticas e anti-tumorais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rashad FM, Fathy HM, El-Zayat AS, Elghonaimy AM. Isolation and characterization of multifunctional Streptomyces species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. Microbiol Res. 2015;175:34-47.
2. Kim BY, Zucchi TD, Fiedler HP, Goodfellow M. Streptomyces cocklensis sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62(Pt 2):279-83.

3. Rahman MA, Choi YH, Pradeep GC, Choi YS, Choi EJ, Cho SS, et al. A novel low molecular weight endo-xylanase from *Streptomyces* sp. CS628 cultivated in wheat bran. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;173(6):1469-80.
4. Balagurunathan R, Radhakrishnan M, Somasundaram S. L-Glutaminase producing actinomycetes from marine sediments–selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Aust J Basic Appl Sci*. 2010;4(5):698-705.
5. Adegboye MF, Babalola OO, Ngoma L, Okoh AI. Analysis of *Streptomyces* spp. Native to Mahikeng Soils in South Africa. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2012;6(3):1001-10.
6. Silva VMA, de Brito FAE, Ramos KA, da Silva RM, Martins CM, Martins SCS. Atividade Enzimática de Actinobactérias do Semiárido (Enzymatic activity of actinobacteria from semiarid). *Revista Brasileira de Geografia Física*. 2015;8:560-72.
7. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Microbiologia de Brock*: Artmed; 2004.
8. Nonomura H, Ohara Y. The distribution of actinomycetes in soil. VI. A selective plate culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains Part I. *J Ferm Technol*. 1969;47:463-9.
9. Shirling Et, Gottlieb D, editors. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst*; 1966: Citeseer.
10. Williams S, Sharpe M, Holt J. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 4. Williams and Wilkins, London. ISBN 0-68309-061-5; 1989. Report No.: Contract No.
11. Petrova D, Vlahov S. Taxonomic characterization of the thermophilic actinomycete strain 21E producer of thermostable Collagenase. 2013.
12. Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. Gram-positive cocci. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology* 9th ed Baltimore: Ed Williams e Wilkins. 1994:544-51.
13. Stirling D. DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. *Methods Mol Biol*. 2003;226:53-4.
14. Lane D. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. 1991:125-75.
15. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1957;23(1):15-22.
16. Conn H, Jennison M, Weeks O. Routine tests for the identification of bacteria. *Manual of microbiological methods*. 1957;6:140-88.
17. Korn-Wendisch F, Kutzner H, Balows A, Truper H, Dworkin M, Harder W, et al. The family Streptomycetaceae. *The Prokaryotes*. 1992(Ed. 2):921-95.
18. Rigo E, Rigoni RE, Lodea P, Oliveira Dd, Freire DM, Luccio MD. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. *Environmental Engineering Science*. 2008;25(9):1243-8.
19. Whitaker JR. Microbial pectolytic enzymes. *Microbial enzymes and biotechnology*: Springer; 1990. p. 133-76.
20. Kashyap P, Sabu A, Pandey A, Szakacs G, Socol CR. Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 2002;38(3):307-12.
21. Pedrolli DB, Monteiro AC, Gomes E, Carmona EC. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnology Journal*. 2009:9-18.
22. Wei Y-S, Fan Y-B, Wang M-J, Wang J-S. Composting and compost application in China. *Resources, Conservation and Recycling*. 2000;30(4):277-300.
23. Kashyap D, Chandra S, Kaul A, Tewari R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World journal of Microbiology and Biotechnology*. 2000;16(3):277-82.

24. Revilla I, José GS. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International journal of food science & technology*. 2003;38(1):29-36.
25. Roberts J, MacAllister TW, Sethuraman N, Freeman AG. Genetically engineered glutaminase and its use in antiviral and anticancer therapy. *Google Patents*; 2001.
26. Koibuchi K, Nagasaki H, Yuasa A, Kataoka J, Kitamoto K. Glutaminase, its gene and a method of producing it. *Google Patents*; 2004.
27. Sabu A, Keerthi T, Kumar SR, Chandrasekaran M. L-Glutaminase production by marine *Beauveria* sp. under solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 2000;35(7):705-10.
28. PLNSN SD, Siddalingeshwara K, Karthic J, Pramod T, Vishwanatha T. Antitumour property l-glutaminase on from *Aspergillus oryzae* through submerged fermentation. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014;3(3):819-23.
29. Kim KK, Park HY, Park W, Kim IS, Lee S-T. *Microbacterium xylanilyticum* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from a biofilm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55(5):2075-9.
30. Srinivasan S, Kim MK, Sathiyaraj G, Kim Y-J, Jung S-K, In J-G, et al. *Microbacterium soli* sp. nov., an α -glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2010;60(3):478-83.