



# Revista Brasileira de Geografia Física

Homepage: [www.ufpe.br/rbgfe](http://www.ufpe.br/rbgfe)



## Atividade Enzimática de Actinobactérias do Semiárido

<sup>1</sup> Valéria Maria Araújo Silva<sup>2</sup>, Francisca Airlane Esteves de Brito<sup>3</sup>, Karoline Alves Ramos<sup>3</sup>, Rhonyele Maciel da Silva<sup>3</sup>, Claudia Miranda Martins<sup>4</sup>, Suzana Claudia Silveira Martins<sup>5</sup>

<sup>1</sup> O texto é parte da dissertação de mestrado do primeiro autor e orientada pelo último autor, no âmbito do Curso de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará. <sup>2</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, CE, [mariavaleria@yahoo.com.br](mailto:mariavaleria@yahoo.com.br). <sup>3</sup> Iniciação Científica, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará; [airlaniaesteves@yahoo.com.br](mailto:airlaniaesteves@yahoo.com.br); [karolinea.ramos@gmail.com](mailto:karolinea.ramos@gmail.com); [rhonyelle@hotmail.com](mailto:rhonyelle@hotmail.com). <sup>4</sup> Professora Doutora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, CE, [claudia.miranda.martins@gmail.com](mailto:claudia.miranda.martins@gmail.com). <sup>5</sup> Professora Doutora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, CE, [suzana220@gmail.com](mailto:suzana220@gmail.com).

Artigo submetido em 10/09/2015 e aceite em 10/12/2015

### RESUMO

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas encontradas principalmente no solo e que se destacam pela capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, como amilase e celulase. Essas enzimas degradam, respectivamente, o amido e a celulose, substratos abundantes no solo, mas que por sua complexidade química são indisponíveis para nutrição de outros organismos. Essas bactérias também crescem em condições extremas, como as prevalentes no Semiárido nordestino, onde ainda são raros estudos sobre esse grupo microbiano. Assim, tendo em vista o crescente interesse sobre o funcionamento biológico do solo, aliado ao aspecto biotecnológico, esse trabalho teve por objetivo avaliar a atividade enzimática de vinte e oito cepas de actinobactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Terrabacter*, *Nocardia* e *Micromonospora* isoladas de amostras de solo do Parque Nacional de Ubajara, no Estado do Ceará. As atividades amilolíticas e celulolíticas foram determinadas pelo índice enzimático correspondente à relação entre o diâmetro em milímetros do halo de hidrólise e o diâmetro em milímetros da colônia de cada cepa. A atividade celulolítica foi detectada em 75% e a amilolítica em 82% das cepas avaliadas. Uma das cepas avaliadas destacou-se com um índice enzimático da celulase igual a 6,90 enquanto o maior índice para a amilase foi 6,23. Os resultados indicaram o potencial ecológico e biotecnológico das actinobactérias do solo da região analisada.

Palavras-chave: enzimas, bactéria, caatinga, Nordeste

### Enzymatic activity of actinobacteria from semiarid

#### ABSTRACT

Actinobacteria are Gram-positive bacteria found in soil and are distinguished by their production of hydrolytic enzymes, such as amylase and cellulase. These enzymes degrade starch and cellulose, respectively, which are abundant substrates in soil, but that are unavailable for use by other organisms due to their chemical complexity. These bacteria grow in extreme conditions, such as those prevalent in the Brazilian semi-arid northeast, where there are also few studies about this microbial group. Thus, due to the growing interest in the biological functioning of the soil, together with the biotechnology aspect, this work aimed to evaluate the enzymatic activity of twenty eight strains of actinobacteria of the genus *Streptomyces*, *Terrabacter*, *Nocardia*, and *Micromonospora* obtained from the soil samples of the Ubajara National Park in the state of Ceará. The amylolytic and cellulolytic activities were determined by the enzymatic index corresponding to the relation between the diameter of hydrolysis halo, in millimeters, and the diameter in millimeters of the colony of each strain. The cellulolytic and amylolytic indexes were detected in 75% and 85% of the evaluated strains, respectively. One of the strains evaluated stood out with an enzyme cellulase index equal to 6.90 while the highest rate for amylase was 6.23. The results indicated the ecological and biotechnological potential of actinobacteria from the soil of analyzed region.

Keywords: enzymes, bacteria, caatinga, Northeast

#### Introdução

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas com elevada concentração de guanina e citosina (G + C) no DNA (Ventura et al., 2007; Cwala et al., 2011; Rao et al., 2012). São

encontradas em diversos ambientes e são importantes componentes da população microbiana na maioria dos solos (Semêdo et al., 2001; Jayasinghe e Parkinson, 2008; Silva et al., 2012; Velayudham e Murungan, 2012; Lima,

2013). O crescimento deste grupo é caracterizado pela formação de hifas e de um micélio aéreo ramificado, apresentando ampla diversidade morfológica (Ventura et al., 2007).

As actinobactérias, particularmente o gênero *Streptomyces*, são reconhecidas pelo seu potencial em produzir uma vasta quantidade de metabólitos secundários, dentre os quais se destacam as substâncias antibióticas, (Anzai et al., 2008; Barreto et al., 2008; Durairandiyar et al., 2010; Miyauchi, 2012). Devido a esta peculiaridade, muitas pesquisas foram e estão sendo executadas com o objetivo de identificar novas espécies e novos metabólitos que possam ser utilizados nas mais diversas áreas científicas. Nesse sentido, estudos em sedimentos marinhos apontaram grande variedade de metabólitos produzidos por actinobactérias, em especial, compostos bioativos usados como antibióticos (Dharmaraj, 2009; Bhavana et al., 2013).

O potencial enzimático das actinobactérias é outro aspecto importante a ser considerado, pois apesar das enzimas ocorrerem amplamente em plantas e animais, as de origem microbiana representam as melhores fontes devido à sua ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética (Altamarano et al., 2000). Depois dos antibióticos, as enzimas são os produtos mais explorados pela indústria biotecnológica e são utilizadas em larga escala nas indústrias têxtil, de papel, de detergente, de couro, de alimento, entre outras (Oliveira et al., 2006). Embora muito exploradas para aplicações biotecnológicas, as actinobactérias também têm importante participação na ecologia do solo, destacando-se os processos de ciclagem de nutrientes, biorremediação e de compostagem, processos decorrentes da degradação enzimática de substratos orgânicos complexos, tóxicos e de resíduos de materiais utilizáveis na agricultura, respectivamente. Também são produtoras de compostos terpenóides responsáveis pelo odor característico do solo (Oliveira et al., 2014), crescem em temperaturas superiores a 50°C, sobrevivem em ambientes hostis e são apontadas como indicadores da qualidade do solo (Ventura et al., 2007; Irfan et al., 2012).

Segundo Lima (2013) as actinobactérias são capazes de crescer em locais antropizados e que apresentem condições ambientais hostis. Fierer et al. (2007) destacam que a abundância desse grupo microbiano tende a ser menor em solos úmidos e maior em solos oligotróficos.

O Semiárido brasileiro é uma região com ampla variedade de ambientes, apresentando heterogeneidade na vegetação, clima, condições

edáficas, amplitudes térmicas elevadas e solos com pouca umidade (Kavamura, 2012). Essas condições são impostas em especial, pelas variações pluviométricas baixas, geralmente abaixo de 800 mm anuais e concentradas em apenas um período do ano, associadas com uma forte intensidade luminosa (Gorlach-Lira e Coutinho, 2007). Assim, solos sob vegetação de Caatinga são habitats bastante peculiares, com características próprias, cuja atividade biológica embora extremamente rica, ainda é pouco explorada (Soares Jr et al., 2012). Kavamura (2012) reportou a predominância de actinobactérias em relação a outros micro-organismos do solo, como fungos, principalmente no período de menor pluviosidade. O bioma Caatinga estende-se pelo domínio de clima semiárido no Brasil e é reconhecido como um dos ambientes mais ricos em biodiversidade (IBAMA, 2015). No entanto, esta riqueza é atribuída principalmente à diversidade vegetal e animal e, raramente, à de micro-organismos (Prado, 2003).

O termo rizosfera é usado para definir a porção do solo que recebe a influência direta das raízes e onde ocorre a liberação de secreções que favorecem o crescimento microbiano (Cardoso e Nogueira, 2007; Haichar et al., 2014). Segundo Cardoso e Nogueira (2007), a quantidade de micro-organismos que ocorrem na rizosfera pode ser até mil vezes maiores que em solo não rizosférico.

As enzimas de interesse na ciclagem de nutrientes são aquelas que catalisam a hidrólise de constituintes da matéria orgânica do solo, como a celulose e o amido (Joshi et al., 1993; Fioretto et al., 2001). A primeira é um polissacarídeo complexo que constitui o principal bloco de construção dos vegetais. É uma das maiores frações de carbono orgânico no solo, representa a metade do carbono orgânico na biosfera e é o mais abundante composto orgânico do mundo (Florêncio et al., 2012). No entanto, apresenta uma estrutura cristalina insolúvel, que dificulta sua reciclagem (Irfan et al., 2012). Micro-organismos que excretam celulasas desempenham, pois, um importante papel na natureza por estabelecerem um elo chave no ciclo do carbono (Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004). Além disso, a celulose tem um elevado valor industrial por ser considerada a fonte menos onerosa de biomassa para a produção de substâncias de elevado valor comercial, tais como açúcar, proteínas e outros produtos químicos através de bioconversão enzimática (Kuhadet et al., 2011; Mohanta, 2014).

O amido está presente em muitas partes dos vegetais, principalmente raiz, caule, fruto e semente, e representa um importante componente de muitos produtos agrícolas (Núñez-Santiago et al., 2004). O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva do reino vegetal e amilases constituem um grupo de enzimas que possuem ação sobre esse carboidrato (Gupta et al., 2003). Assim, micro-organismos produtores dessas enzimas afetam diretamente a disponibilidade de nutrientes para as plantas e para outros micro-organismos, bem como as propriedades químicas e físicas dos solos (Jeffrey et al., 2007). Estudos em áreas com vegetação de Caatinga no semiárido brasileiro estão sendo incrementados, tendo em vista a necessidade de ampliar o conhecimento e definir estratégias de conservação, bem como de uso sustentável dos recursos. As actinobactérias nessa região são ainda pouco conhecidas e merecem atenção especial pelo potencial ecológico e biotecnológico que representam, justificando estudos em busca de espécies capazes de degradar compostos de interesse ambiental e industrial.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade celulolítica e amilolítica de 28 cepas de dos gêneros *Streptomyces*, *Terrabacter*, *Nocardia* e *Micromonospora* isoladas do solo do Parque Nacional de Ubajara, uma Unidade de Proteção Ambiental localizada no Estado do Ceará.

### Material e Métodos

O presente estudo foi realizado na Unidade de Conservação Parque Nacional de Ubajara, na divisa entre os Estados do Ceará e Piauí.

### Área de estudo: Parque Nacional de Ubajara (PARNA Ubajara)

Esta unidade de conservação está localizada no planalto da Ibiapaba, ao norte do Estado do Ceará, a 320 km de Fortaleza, abrangendo parte dos municípios de Ubajara, Frecheirinha e Tianguá, no domínio da Caatinga (coordenadas geográficas 3° 48' – 3° 50' lat. S e 40° 52' – 40° 55' long. W) (Figura 1) (IBDF/FBCN, 1981).

A temperatura do parque varia de 20 °C a 22 °C e o solo é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico (ICMBio, 2015). Há dois períodos climáticos distintos: no primeiro semestre do ano, mais chuvoso e frio, e o segundo semestre, praticamente sem chuvas e com temperaturas mais elevadas.



**Figura 1.** Localização geográfica do Parque Nacional de Ubajara (PARNA Ubajara) no Estado do Ceará, Brasil. Fonte: [www.portalubajara.com.br](http://www.portalubajara.com.br)

A precipitação pluviométrica média fica em torno de 1.463,3 mm por ano. A encosta intercepta os ventos úmidos que vêm do litoral garantindo a umidade, importante por localizar-se em meio a uma área caracterizada por períodos de seca acentuada. Esta combinação de condições únicas de relevo e umidade propicia a ocorrência de uma característica ímpar de vegetação: mata úmida adjacente à mata seca (IBAMA, 2006).

### Amostragem, isolamento e identificação das actinobactérias

As cepas de actinobactérias usadas no presente trabalho estão sendo mantidas em tubos inclinados com meio Caseína Dextrose Ágar (CDA) a 4 °C no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As cepas foram isoladas de amostras de solo rizosférico da área de estudo, coletadas no período de 20 a 24 de agosto de 2012 (período seco). As amostras de solo (0-20 cm de profundidade) foram coletadas na rizosfera de 12 leguminosas: *Centrosema* spp., *Crataegus monogyny*, *Acacia polephella*, *Stryphnodendron pulcherrimum*, *Hymenaea courbari*, *Senna spectabilis*, *Inga* spp., *Caesalpinia* spp., *Bauhinia* spp., *Acacia polephella*, *Piptadenia stipulacea*, *Anadenanthera macrocarpa*, *Mimosa caesalpinifolia*. Na área de projeção da copa de cada espécie, foram coletadas

três amostras equidistantes entre si, que foram unidas para formar uma amostra composta (Lucena et al., 2013). As amostras foram coletadas utilizando-se uma enxada de jardinagem. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos impermeáveis e etiquetados, conservadas em caixas de isopor com gelo e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB), do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde foram processadas para isolamento e identificação das actinobactérias.

### Preparação das amostras

Quinze gramas de cada amostra de solo foram suspensas em 135 mL de solução salina estéril a 0,85% e homogeneizadas em vórtex, a velocidade de 145 rpm, por 30 minutos (diluição  $10^{-1}$ ). A partir desta diluição, as amostras foram diluídas de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ . Em seguida, 100  $\mu$ L de cada diluição foram inoculados, em triplicata, em placas contendo meio de cultura Caseína Dextrose Ágar (CDA) adicionado 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de nistatina, para inibir o crescimento de fungos contaminantes. Após incubação a 28 °C por 2 a 3 semanas, as colônias isoladas foram caracterizadas quanto aos aspectos macroscópicos (cor da massa aérea dos micélios, pigmentos reversos e pigmentos melanóides) e 28 colônias com características diferentes foram selecionadas. Essas cepas foram codificadas como "UB", indicativo de Ubajara, seguido pelo número do isolado e a diluição correspondente ao isolamento, representada por "R" (UB01R1, UB03R2, UB03R2, UB04R1, UB04R2.....UB21R2) e foram avaliadas quanto às características microscópicas (morfológicas e micromorfológicas por microcultivo) (Martins et al., 2014).

A técnica de microcultivo permitiu a observação das seguintes características: presença ou ausência de micélio no substrato, fragmentação do micélio substrato, presença de escleródios ou esporângio, esporulação em micélio de substrato e morfologia da cadeia de esporos. A partir desses parâmetros foi realizada a identificação das cepas de actinobactérias a nível provável de gênero, com base no Manual de Bacteriologia Determinativa do Bergey (Holt et al., 1994). Os resultados foram sugestivos dos seguintes gêneros de actinobactérias: quatorze (14) cepas de *Streptomyces*, sete (7) cepas de *Terrabacter*, seis (6) cepas de *Nocardia* e uma (1) cepa de *Micromonospora*.

### Atividade enzimática

As vinte e oito cepas de actinobactérias isoladas foram avaliadas quanto à sua capacidade para produzir as enzimas hidrolíticas amilase e celulase.

### Produção de amilase

A produção de amilase foi determinada conforme descrito por Coon et al. (1957), modificada conforme descrito a seguir. As cepas de actinobactérias foram inoculadas na forma de spots e em duplicata no meio de cultura Ágar amido constituído de 6,6% de amido solúvel. Posteriormente, as culturas foram incubadas a 28±2 °C por 10 dias. Após o crescimento das colônias, foram adicionados 10 mL da solução de lugol (1% iodo em 2% iodeto de potássio) nas placas. A produção da enzima amilase foi detectada pela descoloração do meio, formando uma zona amarela suave em torno da colônia, em contraste com o meio azul resultante da reação do amido com o iodo. O halo foi resultante da hidrólise do amido. Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com paquímetro (mm) colocado no reverso das placas de Petri.

### Produção de celulase

A atividade celulolítica das actinobactérias foi avaliada segundo Lewis (1988), utilizando meio de cultivo sólido mineral suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (NaNO<sub>3</sub>: 3,0 g L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>: 0,5 g L<sup>-1</sup>; KCl: 0,5 g L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 10,0 mg L<sup>-1</sup>; CMC: 10,0 g L<sup>-1</sup>; ágar: 20,0 g L<sup>-1</sup>). As cepas de actinobactérias foram inoculadas nesse meio na forma de spots, em duplicata e incubadas a 28±2 °C por 10 dias. Após a incubação, foram adicionados 10 mL de solução de vermelho congo a 0,5% em cada placa, deixando-se agir por 15 minutos sob temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso da solução foi drenado e 10 mL de solução de NaCl (1 M) foram adicionados em cada placa, deixando-se agir por 30 minutos sob temperatura ambiente. Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com paquímetro e expressos em milímetros.

### Índice Enzimático

A atividade hidrolítica foi estimada semi-quantitativamente usando-se um índice enzimático (IE) utilizando-se a seguinte equação: IE = Dh/Dc. Sendo Dh o diâmetro em mm do halo de hidrólise e Dc o diâmetro em mm da colônia das actinobactérias (Stamford et al., 1998). As cepas

que apresentaram um IE superior a 1,50 foram consideradas como potenciais produtores de amilase e celulase.

**Análises estatísticas**

Para cada atividade enzimática foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Para cada cepa foi calculado o IE médio dos dois experimentos, em conjunto com o desvio padrão.

Os dados de índice enzimático foram submetidos às análises de variância e, nos casos em que foram constatadas variações significativas entre os fatores estudados, os isolados foram

comparados entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o Sistema de Análise Estatística (ESTAT 2.0).

**Resultados e Discussão**

A zona mais clara ao redor das colônias, correspondente ao halo indicador da degradação do amido foi observada em 23 cepas, ou seja, 82% das actinobactérias estudadas. Observa-se que os diâmetros das zonas de inibição entre as cepas de actinobactérias variaram de  $10,50 \pm 2,08$  mm (UB-10-R2, do gênero *Nocardia*) a  $42,25 \pm 3,30$  mm (UB-01-R1, do gênero *Terrabacter*) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Índice enzimático (IE) de amilase de cepas de actinobactérias isoladas do Parque Nacional de Ubajara no Ceará cultivadas em meio Ágar caseína dextrose por 10 dias a 28°C. Os resultados correspondem à média de duas repetições, em duplicata

Cepas	Provável gênero	D <sub>c</sub> (mm)	D <sub>h</sub> (mm)	IE
UB-01-R1	<i>Terrabacter</i>	$37,50 \pm 3,70$	$42,25 \pm 3,30$	1,12 <sup>a</sup>
UB-09-R1	<i>Terrabacter</i>	$11,75 \pm 0,96$	$15,75 \pm 0,96$	1,34 <sup>ab</sup>
UB-07-R1	<i>Streptomyces</i>	$9,75 \pm 2,06$	$15,25 \pm 3,01$	1,56 <sup>ab</sup>
UB-10-R2	<i>Nocardia</i>	$6,00 \pm 0,00$	$10,50 \pm 2,08$	1,75 <sup>ab</sup>
UB-17-R2	<i>Terrabacter</i>	$11,00 \pm 4,55$	$20,00 \pm 5,94$	1,81 <sup>ab</sup>
UB-10-R1	<i>Streptomyces</i>	$9,75 \pm 1,26$	$18,75 \pm 1,50$	1,92 <sup>ab</sup>
UB-10-R3	<i>Nocardia</i>	$9,25 \pm 1,50$	$19,25 \pm 0,96$	2,08 <sup>ab</sup>
UB-05-R1	<i>Streptomyces</i>	$8,00 \pm 0,82$	$17,75 \pm 3,40$	2,21 <sup>ab</sup>
UB-18-R3	<i>Streptomyces</i>	$7,50 \pm 0,58$	$16,75 \pm 0,96$	2,23 <sup>ab</sup>
UB-20-R2	<i>Streptomyces</i>	$8,75 \pm 0,96$	$19,75 \pm 2,36$	2,25 <sup>ab</sup>
UB-14-R1	<i>Nocardia</i>	$6,75 \pm 2,21$	$15,50 \pm 0,58$	2,29 <sup>ab</sup>
UB-09-R2	<i>Terrabacter</i>	$8,75 \pm 2,63$	$21,00 \pm 2,83$	2,40 <sup>ab</sup>
UB-03-R1	<i>Streptomyces</i>	$14,00 \pm 1,50$	$34,00 \pm 3,46$	2,42 <sup>ab</sup>
UB-08-R1	<i>Streptomyces</i>	$14,50 \pm 1,91$	$36,00 \pm 1,15$	2,48 <sup>ab</sup>
UB-13-R1	<i>Nocardia</i>	$9,00 \pm 1,63$	$22,50 \pm 1,29$	2,50 <sup>ab</sup>
UB-11-R2	<i>Nocardia</i>	$7,75 \pm 2,50$	$19,50 \pm 1,73$	2,51 <sup>ab</sup>
UB-05-R3	<i>Streptomyces</i>	$11,50 \pm 1,38$	$31,50 \pm 7,05$	2,73 <sup>ab</sup>
UB-04-R1	<i>Terrabacter</i>	$13,50 \pm 3,11$	$37,75 \pm 3,30$	2,79 <sup>b</sup>
UB-03-R2	<i>Micromonospora</i>	$11,75 \pm 2,63$	$33,25 \pm 3,46$	2,82 <sup>b</sup>
UB-07-R3	<i>Streptomyces</i>	$12,50 \pm 1,73$	$36,50 \pm 3,32$	2,92 <sup>b</sup>
UB-13-R2	<i>Streptomyces</i>	$12,00 \pm 1,41$	$36,50 \pm 1,29$	3,04 <sup>b</sup>
UB-06-R1	<i>Streptomyces</i>	$7,75 \pm 2,22$	$37,50 \pm 4,65$	4,83 <sup>c</sup>
UB-04-R2	<i>Streptomyces</i>	$6,50 \pm 1,29$	$40,50 \pm 3,11$	6,23 <sup>c</sup>

D<sub>c</sub> = diâmetro da colônia (mm); D<sub>h</sub> = diâmetro do halo (mm); IE = índice enzimático. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas cepas de actinobactérias UB-07-R2, UB-15-R2, UB-17-R1, UB-18-R2 e UB-21-R2 (21,7%), respectivamente dos gêneros *Streptomyces*, *Terrabacter*, *Streptomyces*, *Streptomyces* e *Nocardia*, não foi observado formação de halo enzimático de degradação, indicando que esses isolados não apresentam atividade amilolítica.

A escassez de estudos sobre atividade enzimática de actinobactérias isoladas do

Semiárido brasileiro dificulta a comparação dos resultados. No entanto, o percentual de 82% foi similar ao reportado por Jaralla et al. (2014) que, ao avaliarem a atividade amilolítica de cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo do Iraque, constataram que 80% foram positivas para a produção de amilase. Em contrapartida, Sampathkumar (2014), avaliando o potencial amilolítico de 101 cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo marinho,

evidenciaram que somente 56, correspondente a 56,4%, mostraram-se positivos para essa atividade. Sathya e Ushadevi (2014) descreveram um percentual superior ao avaliar a presença de amilase em 35 cepas de actinobactérias de solo do mangue na Índia. Esses autores constataram que 31 (88,6%) foram positivas para a referida característica.

Segundo Vigal et al. (1991), a ocorrência de amilase em actinobactérias é frequentemente observada nos gêneros *Streptomyces* e *Nocardia*, os quais também apresentaram atividade amilase neste estudo (Tabela 1) Rodrigues (2006) analisou a produção de amilase em 188 cepas de actinobactérias e também observou uma predominância dos gêneros *Nocardia*, *Streptomyces*, *Terrabacter* e *Nocardiosis*. Os três primeiros também foram predominantes no presente estudo. Importante ressaltar que Sousa et al. (2008), em um estudo sobre o papel de *Streptomyces* na promoção do crescimento das plantas e no controle biológico de fitopatógenos, observaram que os isolados investigados produziam amilase. Assim, é possível conjecturar que as 12 cepas de *Streptomyces* com atividade amilolítica observadas no presente estudo apresentem potencial para as aplicações referendadas por Sousa et al. (2008).

Numa tentativa de comparar o potencial enzimático das cepas de actinobactérias neste estudo, foi estabelecido um índice enzimático que variou de 1,12 a 6,23, destacando-se que entre as cepas do gênero *Streptomyces* essa variação foi de 1,56 a 6,23. Karanja et al. (2010) observaram a degradação do amido com IE entre 3,4 e 5,2 para todas as espécies de *Streptomyces* isoladas de solos no Quênia. Observa-se que o maior índice enzimático observado por aqueles autores foi inferior ao encontrado no presente trabalho. Para outros gêneros de actinobactérias, como *Actinomyces pyogenes*, Aysha et al. (2006) relataram um IE de 1,2.

Importante comentar que algumas colônias de *Streptomyces* com pouco crescimento apresentaram os maiores índices enzimáticos, como UB-04-R2 (diâmetro da colônia = 6,50 mm, índice = 6,23), UB-06-R1 (diâmetro da colônia = 6,75 mm, índice = 4,83) (Tabela 1). Embora na literatura nenhuma menção tenha sido registrada para actinobactérias, resultados semelhantes foram observados para fungos filamentosos, os quais apresentam características morfológicas muito semelhantes às actinobactérias. Por exemplo, Nogueira e Cavalcanti (1996) avaliando a atividade celulolítica em 48 linhagens de fungos isolados de aveia industrializada, observaram

colônias de menor diâmetro e maiores valores de atividade da celulase. Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) fizeram a mesma constatação em 80 linhagens de fungos filamentosos isolados do solo da Mata Atlântica da região conhecida como Banhado Grande, Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo. O IE amilásico das cepas UB-04-R2 e UB-06-R1 (Tabela 1) mostra que, apesar de apresentarem menor crescimento e, conseqüentemente, menor produção de biomassa, as mesmas expressam significativo potencial de produção e excreção enzimática de amilase. Esse resultado indica que somente a medida do halo de inibição é insuficiente como medida da atividade enzimática e mostra a importância do teste do vermelho congo como um parâmetro simples e rápido para selecionar cepas com potencial enzimático significativo.

A análise estatística mostrou que houve diferença entre os índices enzimáticos das cepas de actinobactérias analisadas. Duas cepas destacaram-se das demais em relação ao índice enzimático: UB-06-R1 e UB-04-R2 com IEs de 4,83 e 6,23 respectivamente. Por outro lado, 20 cepas não diferiram estatisticamente entre si, apresentando IE entre 1,34 e 3,04. Minotto et al. (2014), trabalhando com 23 cepas de actinobactérias isoladas de raízes de tomates, observaram que à temperatura de 28°C, a mesma usada neste estudo, 73,91% das cepas foram capazes de degradar o amido e o maior índice enzimático registrado foi IE=6,46, muito semelhante ao maior valor de IE da cepa UB-04-R2, que se destacou pelo índice enzimático de 6,23 (Tabela 1).

A literatura não disponibiliza valores de IE que classifiquem os micro-organismos quanto à produção de amilase. Alguns trabalhos como o de Fungaro e Maccheroni (2002) fazem esta correlação para o IE da celulase. Esses autores sugeriram que IEs maiores que 1,0 são indicativos de excreção de enzimas. Fazendo uma comparação com os IEs da amilase apresentadas pelas cepas de actinobactérias do presente estudo, vinte e três cepas (82%) mostraram IE maior que 1,0 e são, portanto, classificadas como produtoras e excretoras de amilase. Por outro lado, para Bispo (2010) valores superiores a 2,0 são característicos de atividade enzimática significativa. Por esse critério, as cepas UB-10-R3, UB-05-R1, UB-18-R3, UB-20-R2, UB-14-R1, UB-09-R2, UB-03-R1, UB-08-R1, UB-13-R1, UB-11-R2, UB-05-R3, UB-04-R1, UB-03-R2, UB-07-R3, UB-13-R2, UB-06-R1, UB-04-R2, podem ser consideradas promissoras para produção de amilase. Florêncio et al. (2012)

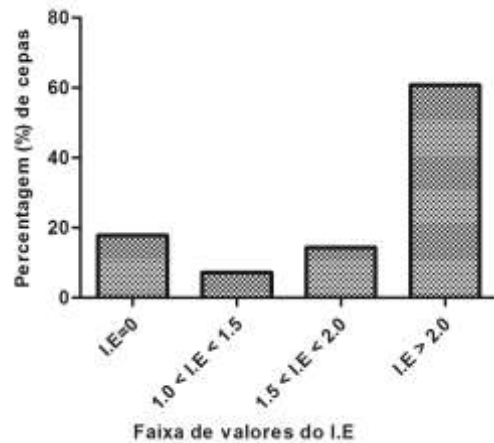
classificaram cepas com IE superior a 1,50 como potenciais produtores de enzimas. Por essa classificação, 21 cepas de actinobactérias (UB-07-R1, UB-10-R2, UB-17-R2, UB-10-R1, UB-10-R3, UB-05-R1, UB-18-R3, UB-20-R2, UB-14-R1, UB-09-R2, UB-03-R1, UB-08-R1, UB-13-R1, UB-11-R2, UB-05-R3, UB-04-R1, UB-03-R2, UB-07-R3, UB-13-R2, UB-06-R1, UB-04-R2), representado 75% do total de cepas avaliadas, foram classificadas com produtoras de amilase. Todas as referências aqui citadas como padrão do IE, são de trabalhos realizados com fungos. No entanto, Behera et al. (2014) avaliaram o IE de 15 cepas de actinobactérias de um mangue na Índia e os valores obtidos variaram de 1,25 a 1,82.

Visando suprir uma lacuna na classificação do potencial enzimático, particularmente de cepas de actinobactérias do Semiárido brasileiro, sugere-se a seguinte escala, tendo como parâmetro o IE: Cepas fortemente produtoras ( $IE \geq 2$ ), (UB-10-R3, UB-05-R1, UB-18-R3, UB-20-R2, UB-14-R1, UB-09-R2, UB-03-R1, UB-08-R1, UB-13-R1, UB-11-R2, UB-05-R3, UB-04-R1, UB-03-R2, UB-07-R3, UB-13-R2, UB-06-R1, UB-04-R2, 60,7%), cepas moderadamente produtoras de amilase ( $1,5 \leq IE < 2,0$ ) (UB-07-R1, UB-10-R2, UB-17-R2 e UB-10-R1, 14,3%), cepas fracamente produtoras ( $1,0 \leq IE < 1,5$ ) (UB-01-R1 e UB-09-R1, 7,4%) e cepas não produtoras de amilase ( $IE = 0$ ) (UB-07-R2, UB-15-R2, UB-17-R1, UB-18-R2 e UB-21-R2, 21,7%). O percentual das cepas de actinobactérias avaliadas no presente estudo, quanto à intensidade de produção de amilase está representado na Figura 2.

Micro-organismos degradadores da celulose desempenham um importante papel na decomposição de matéria orgânica, na mineralização de nutrientes e na promoção do crescimento das plantas. Eles também podem atuar como agentes no controle biológico de alguns fungos fitopatogênicos, como *Phytophthora* e *Pytium*, cujo teor de celulose na parede celular está entre 17% e 35% (Lima, 1998). As celulasas convertem celulose em açúcares fermentáveis simples de fácil acesso para consumo humano e o gênero *Streptomyces* é conhecido como o maior produtor de celulasas (Mohanta, 2014).

A zona mais clara ao redor das colônias, correspondente ao halo indicador da degradação da celulose, foi observada em 21 cepas, ou seja, 75% das actinobactérias estudadas. O diâmetro dos halos de inibição das cepas de actinobactérias avaliadas variou de  $3,75 \pm 0,5$  a  $31,75 \pm 2,36$ , enquanto o índice enzimático variou de 1,18 na

cepa UB-03-R1 a 6,90 na cepa UB-05-R1 (Tabela 2).



**Figura 2.** Classificação da intensidade de produção de amilase das cepas de actinobactérias isoladas do solo rizosférico do Parque Nacional de Ubajara no Estado do Ceará, em função do índice enzimático (IE)

O percentual de cepas produtoras de celulase (75%) foi inferior ao das produtoras de amilase (82%), possivelmente em função da maior complexidade química da celulose. Nas cepas de actinobactérias UB-04-R1, UB-07-R1, UB-10-R1, UB-13-R1, UB-15-R2, UB-20-R2 e UB-21-R2, respectivamente dos gêneros, *Terrabacter*, *Streptomyces*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Terrabacter*, *Streptomyces* e *Nocardia*, não foi observado formação do halo enzimático de degradação, indicando que referidas cepas não apresentam atividade celulolítica.

Como comentado anteriormente para atividade amilolítica entre actinobactérias isoladas do Semiárido brasileiro, também ainda são muito incipientes estudos sobre o potencial celulolítico desse grupo bacteriano no referido habitat, particularmente na Caatinga, o que embora reforce a importância do presente estudo, dificulta a comparação de resultados. Assim, destacamos alguns trabalhos com atividade celulolítica de actinobactérias provenientes de outros ecossistemas, como o de Mohan e Charya (2012), que trabalhando com oito actinobactérias isoladas de água fresca, encontraram 7 cepas (85%) produtoras de celulase e 8 (100%) produtoras de amilase. Esse resultado corrobora com o fato da maior complexidade da celulose. Estudo realizado por Minotto et al. (2014) revelou que 30% de cepas de actinobactérias isoladas de raízes de tomate no Estado do Rio Grande do Sul, foram capazes de degradar a carboximetilcelulose. Esse

resultado mostra a superioridade das cepas de actinobactérias avaliadas no presente estudo. Por outro lado, Nunes (2010) testou 48 cepas de actinobactérias isoladas de um processo de compostagem no solo e constatou que todas apresentaram capacidade de degradar a carboximetilcelulose, cujos halos de hidrólise variaram de 5 mm a 35 mm de diâmetro. Constata-se que embora a percentagem de produtoras de celulase tenha sido superior a do presente estudo, a variação das zonas de inibição foi semelhante. Vale ressaltar ainda que a

quantidade de celulose em materiais de compostagem é superior àquela disponível no solo, o que pode explicar o maior percentual registrado por Nunes (2010) e por Rodrigues (2006), que, avaliando o potencial enzimático de actinobactérias oriundas de compostagem relataram a capacidade celulolítica em 91% das cepas. Jaradat et al. (2008) estudando actinobactérias em amostras de solo do Iraque, observaram que 94% dos isolados foram positivos para celulase.

**Tabela 2.** Índice enzimático (IE) de celulase de cepas de actinobactérias isoladas do Parque Nacional de Ubajara no Estado do Ceará cultivadas em meio Ágar caseína dextrose por 10 dias a 28°C. Os resultados correspondem à média de duas repetições, em duplicata

Cepas	Provável gênero	D <sub>c</sub> (mm)	D <sub>h</sub> (mm)	IE
UB-03-R1	<i>Streptomyces</i>	9,25 ± 0,96	11,00 ± 1,83	1,18 <sup>a</sup>
UB-08-R1	<i>Streptomyces</i>	15,00 ± 2,45	19,25 ± 4,03	1,28 <sup>ab</sup>
UB-10-R2	<i>Nocardia</i>	13,50 ± 3,42	18,25 ± 3,30	1,35 <sup>abc</sup>
UB-01-R1	<i>Terrabacter</i>	5,75 ± 0,96	8,50 ± 1,29	1,47 <sup>abc</sup>
UB-13-R2	<i>Streptomyces</i>	18,50 ± 4,50	27,75 ± 6,60	1,50 <sup>abc</sup>
UB-06-R1	<i>Streptomyces</i>	17,75 ± 2,06	27,25 ± 3,10	1,53 <sup>abc</sup>
UB-17-R2	<i>Terrabacter</i>	12,00 ± 3,92	18,75 ± 3,40	1,56 <sup>abc</sup>
UB-03-R2	<i>Micromonospora</i>	14,00 ± 5,94	23,5 ± 3,11	1,67 <sup>abc</sup>
UB-11-R2	<i>Nocardia</i>	9,00 ± 1,41	15,75 ± 0,96	1,75 <sup>abc</sup>
UB-18-R2	<i>Streptomyces</i>	15,50 ± 2,38	28,00 ± 5,66	1,80 <sup>abc</sup>
UB-09-R1	<i>Terrabacter</i>	9,25 ± 1,71	17,50 ± 2,38	1,89 <sup>abc</sup>
UB-14-R1	<i>Nocardia</i>	13,00 ± 2,31	27,00 ± 3,56	2,07 <sup>abc</sup>
UB-18-R3	<i>Streptomyces</i>	15,00 ± 2,45	31,50 ± 3,51	2,10 <sup>abc</sup>
UB-17-R1	<i>Streptomyces</i>	1,75 ± 0,50	3,75 ± 0,5	2,14 <sup>abc</sup>
UB-05-R3	<i>Streptomyces</i>	14,25 ± 0,96	30,75 ± 1,26	2,15 <sup>abc</sup>
UB-07-R3	<i>Streptomyces</i>	12,5 ± 1,91	27,25 ± 5,56±	2,18 <sup>abc</sup>
UB-09-R2	<i>Terrabacter</i>	9,00 ± 2,00	20,25 ± 1,71	2,25 <sup>abc</sup>
UB-07-R2	<i>Streptomyces</i>	12,50 ± 1,29	29,00 ± 1,15	2,32 <sup>abc</sup>
UB-04-R2	<i>Streptomyces</i>	13,25 ± 2,22	31,75 ± 2,36	2,39 <sup>bc</sup>
UB-10-R3	<i>Nocardia</i>	10,25 ± 1,71	25,75 ± 5,68	2,51 <sup>c</sup>
UB-05-R1	<i>Streptomyces</i>	2,50 ± 0,58	17,25 ± 0,96	6,90 <sup>d</sup>

D<sub>c</sub> = diâmetro da colônia (mm); D<sub>h</sub> = diâmetro do halo (mm); IE = índice enzimático. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No entanto, os halos de atividade celulolítica foram inferiores ao do presente estudo, com 81% dos isolados apresentando halo de hidrólise menor que 10 mm e apenas 1% com diâmetro entre 20 mm e 25 mm. Das et al. (2014) isolaram 646 colônias de actinobactérias de diferentes amostras de solo na Índia e detectaram que 549 (85%) desses isolados foram positivos para a degradação da celulose. Em estudo semelhante, também na Índia, Kumar et al. (2013) isolaram e avaliaram a atividade enzimática da celulase em 65 cepas de e os resultados mostraram que 25 cepas (38,46%) foram positivas para essa característica, o que evidencia a diversidade das

actinobactérias em solos de um mesmo país. Os valores reportados por Das et al. (2014) foram superiores aos observados para as cepas avaliadas neste trabalho, mas os de Kumar et al. (2013) foram inferiores. Entre actinobactérias isoladas de folhas frescas, Singh e Padmavathy (2014) registraram que, de 12 cepas avaliadas, 75% exibiram atividade amilolítica e 50% atividade celulolítica, enquanto que, em folhas caídas, de 10 cepas, 80% apresentaram atividade amilase e 60% apresentaram atividade de celulase por ocorrência de zona hidrolítica à volta das colônias. Um dos raros estudos sobre atividade celulolítica de actinobactérias de uma região da Caatinga foi realizado por Bispo (2010). Nesse estudo o autor,



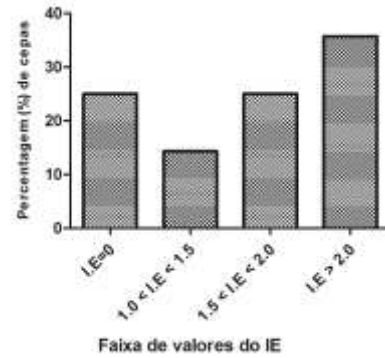
ao avaliar 80 cepas de actinobactérias, reportou a presença de atividade celulolítica em 33% das mesmas. Comparando esses dados com os obtidos no atual trabalho, é possível constatar a superioridade do potencial celulolítico das cepas oriundas no Parque Nacional de Ubajara.

Os índices enzimáticos para a celulase variaram de 1,18 a 6,90 (Tabela 2). Behera et al. (2014), ao avaliarem o potencial celulolítico de 15 cepas de actinobactérias isoladas de solo de mangue, constataram que os índices enzimáticos variaram de 1,25 a 2,50. Assim, com exceção da cepa UB-05-R1, que apresentou um índice enzimático de 6,90, a variação do IE<sub>s</sub> apresentados na Tabela 2, foi semelhante à descrita por Behera et al. (2014). Minotto et al. (2014) destacaram que dentre 23 cepas isoladas de raízes de tomate, sete (30,4%) apresentaram atividade celulolítica e uma das cepas exibiu IE  $\geq 4$ , significativamente maior que as demais. Esses autores consideraram que valores maiores que 1,0 são característicos de actinobactérias com potencial biotecnológico. Nesse contexto, as cepas avaliadas no presente estudo são potencialmente promissoras para aplicações industriais, particularmente a cepa de *Streptomyces* codificada como UB-05-R1.

Aproximadamente 43% das cepas de actinobactérias produtoras de amilase e 38% de celulase observadas nesse estudo pertencem ao gênero *Streptomyces*. Esses números estão de acordo com Bispo (2010), o qual afirma que enzimas, particularmente as celulolíticas, são produzidas principalmente por actinobactérias pertencentes este gênero. Basílio et al. (2003) e Sheetal e Modi (2013) também destacam que o gênero de actinobactéria mais comumente encontrado no solo é o *Streptomyces*.

Assim como observado e discutido na degradação do amido, a colônia de *Streptomyces* (UB-05-R1) com pouco crescimento (diâmetro da colônia de 2,5 cm) apresentou o maior IE para a celulase (6,90) (Tabela 2). Resultados semelhantes foram descritos por Nogueira e Cavalcanti (1996) e Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004). Essa constatação reforça a importância IE como uma ferramenta quantitativa prática para a seleção e a comparação da produção enzimática de celulose de diferentes isolados microbianos.

A mesma escala sugerida para classificar percentualmente as cepas de actinobactérias quanto à intensidade de produção de amilase foi aplicada para a celulase (Figura 3).



**Figura 3.** Classificação da intensidade de produção de celulase das cepas de actinobactérias isoladas do Parque Nacional de Ubajara no Estado do Ceará, em função do índice enzimático (IE)

Segundo a escala estabelecida para a atividade amilolítica, 35,7% das cepas de actinobactérias são fortemente produtoras de celulase, 25% são moderadamente produtoras, 14,3% são fracamente produtoras e 25% não são produtoras dessa enzima (Figura 3). O perfil enzimático (celulase) das cepas de actinobactérias isoladas do Parque Nacional de Ubajara (Figura 3) foi mais restrito que o da amilase (Figura 2). Na primeira, o maior percentual de cepas apresentou IE na faixa de 1,0 a 2,0, enquanto para a amilase essa faixa foi 1,0 a 2,5, confirmando a maior complexidade química da celulose em relação ao amido. Segundo critério estabelecido por Fungaro e Maccheroni (2002), valores de IE maiores que 1,0 são indicativos de excreção de enzimas, enquanto para (Bispo, 2010) esses valores devem ser superiores a 2,00. Silva et al. (2015) reportaram 75% cepas de actinobactérias isoladas do solo do semiárido com atividade celulolítica, e 36% mostraram índice enzimático (IE)  $\geq 2$ . Por esse critério, 10 cepas (35%) avaliadas no presente estudo (UB-04-R2, UB-05-R1, UB-05-R3, UB-07-R2, UB-07-R3, UB-09-R2, UB-10-R3, UB-14-R1, UB-17-R1, UB-18-R3) exibiram um IE superior a 2,00.

Um total de 19 cepas de actinobactérias (67,9%) foram capazes de produzir as enzimas celulase e amilase. As cepas UB-04-R1, UB-07-R1, UB-10-R1, UB-13-R1, UB-18-R2 E UB-20-R2 (21,4%) produziram somente celulase enquanto as cepas UB-07-R2, UB-17-R1 e UB-20-R2 (10,7%), sintetizaram somente celulase (Tabela 3).

**Tabela 3.** Índices enzimáticos (IE) celulolítico e amilolítico das cepas de actinobactérias isoladas do solo do Parque Nacional de Ubajara no Ceará

Cepas de actinobactérias	Provável gênero	IE (celulase)	IE (amilase)	Cepas de actinobactérias
UB-01-R1	<i>Terrabacter</i>	1,47	1,12	UB-01-R1
UB-03-R1	<i>Streptomyces</i>	1,18	2,42	UB-03-R1
UB-03-R2	<i>Micromonospora</i>	1,67	2,82	UB-03-R2
UB-04-R1	<i>Terrabacter</i>	0,00	2,79	UB-04-R1
UB-04-R2	<i>Streptomyces</i>	2,39	6,23	UB-04-R2
UB-05-R1	<i>Streptomyces</i>	6,90	2,21	UB-05-R1
UB-05-R3	<i>Streptomyces</i>	2,15	2,73	UB-05-R3
UB-06-R1	<i>Streptomyces</i>	1,53	4,83	UB-06-R1
UB-07-R1	<i>Streptomyces</i>	0,00	1,56	UB-07-R1
UB-07-R2	<i>Terrabacter</i>	2,32	0,00	UB-07-R2
UB07-R3	<i>Streptomyces</i>	2,18	2,92	UB07-R3
UB-08-R1	<i>Streptomyces</i>	1,28	2,48	UB-08-R1
UB-09-R1	<i>Terrabacter</i>	1,89	1,34	UB-09-R1
UB-09-R2	<i>Terrabacter</i>	2,25	2,4	UB-09-R2
UB-10-R1	<i>Streptomyces</i>	0,00	1,92	UB-10-R1
UB-10-R2	<i>Nocardia</i>	1,35	1,75	UB-10-R2
UB-10-R3	<i>Nocardia</i>	2,51	2,08	UB-10-R3
UB-11-R2	<i>Nocardia</i>	1,75	2,51	UB-11-R2
UB-13-R1	<i>Nocardia</i>	0,00-	2,5	UB-13-R1
UB-13-R2	<i>Streptomyces</i>	1,5	3,04	UB-13-R2
UB-14-R1	<i>Nocardia</i>	2,07	2,29	UB-14-R1

As cepas UB-15-R2, UB-21-R2, respectivamente dos gêneros *Terrabacter* e *Streptomyces* foram incapazes de sintetizar e excretar tanto amilase como celulase. Com exceção da cepa UB-05-R1, que apresentou IE para celulase igual a 6,90 e as cepas UB-06-R1 e UB-04-R2 que mostraram IEs para a amilase de 4,83 e 6,23, respectivamente, as demais cepas exibiram um perfil semelhante (Tabela 3).

É importante destacar que neste trabalho foram avaliadas culturas puras de actinobactérias produtoras de amilases e celulasas. No entanto, Garlipp (1995) destaca que, na natureza, a interação com outros organismos que degradam vários polímeros permite a completa mineralização dos substratos amido e celulose nos ecossistemas onde estes organismos estão inseridos.

### Conclusões

Os resultados do presente trabalho mostraram o potencial celulolítico e amilolítico de cepas de actinobactérias isoladas do solo do Semiárido do Nordeste do Brasil. As cepas de *Streptomyces* UB-05-R1 e UB-06-R1 se destacaram apresentando índices celulolíticos e amilolítico de 6,90 e 4,83, respectivamente. Essas cepas representam um potencial biotecnológico a ser explorado para a produção industrial das enzimas amilase e celulase, bem como para melhorar a qualidade de solos degradados e

desertificados. Esse estudo contribui também para mostrar o potencial do Semiárido nordestino, especificamente da Caatinga, como um nicho promissor para obtenção de actinobactérias capazes de degradar substratos complexos.

### Agradecimentos

Ao CNPq e à UFC pelo suporte financeiro e pela colaboração.

### Referências

- Altamirano, M.M., Blackburn, J.M., Aguayo, C., Fersht, A.R., 2000. Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold. *Nature* 403, 617-622.
- Anzai, K., Nakashima, T., Kuwahara, N., Suzuki, R., Ohfuku, Y., Takeshita, S., Ando, K., 2008. Actinomycete bacteria isolated from the sediments at coastal and offshore area of Nagasaki prefecture, Japan: diversity and biological activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 215-217.
- Aysha, J I.C., Edweis, C.B., Jose, D G., 2006. Enzyme activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda deurrens* Cham (Carobinha-do-Campo). *Brazilian Archives of Biology and Biotechnology* 49, 353-359.
- Barreto, T. R., Silva, A.C.M., Soares, A.C.F., Souza, J., 2008. Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated

- to the rhizosphere of *Theobroma cacao*. Brazilian Journal of Microbiology 39, 464-470.
- Basílio, A., González, I., Vicente, M., Gorroch-Ategui, J., Cabello, A., González, A., Genilloud, O., 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. Journal of Applied Microbiology 95, 814-823.
- Behera, B.C., Parida, S., Dutta, S.K., Thatoi, H.S., 2014. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi River Delta and their cellulase production ability. American Journal of Microbiological Research 2, 41-46.
- Bhavana, M., Prasad, K.S., Rajagopal, S.V., 2013. Screening and isolation of antagonistic actinobacteria from marine sediments of Visakhapatnam sea coast. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences 3, 767-770.
- Bispo, A.S.R., 2010. Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no estado da Bahia e seu potencial na produção de enzimas lingocelulolíticas. Dissertação (Mestrado). Cruz das Almas, UFRB.
- Cardoso, E.J.B. N., Nogueira, M.A., 2007. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas, in: Silveira, A.P.D., Freitas, S. S. (Orgs.), Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Instituto Agrônomo, Campinas.
- Coon, H.J., Jennison, M.W., Week, O.B., 1957. Routine tests for the identification of bacteria, in: Manual of Microbiological Methods (ed. Society of American Bacteriologists). McGraw-Hal, New York, pp. 239-262.
- Cwala, Z., Igbinsa, E.O., Okon. A.I., 2011. Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 5, 118-124.
- Das, P., Solanki, R., Khanna, M., 2014. Isolation and screening of cellulolytic actinomycetes from diverse habitats. International Journal of Advanced Biotechnology and Research 5, 438-451.
- Dharmaraj, S., Ashokkumar, B., Dhevendaran, K., 2009. Fermentative production of carotenoids from marine actinomycetes. Iranian Journal of Microbiology 1, 36-41.
- Duraipandiyan, V., Sasi, A.H., Islam, V.I.H., Valanarasu, M., Ignacimuthu, S., 2010. Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. Journal of Medical Mycology 20, 15-20.
- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. Ecology 88, 1354-1364.
- Fiorreto, A., Papa, S., Sorrentino, G., Fuggi, A., 2001. Decomposition of *Cistus incanus* leaf litter in a Mediterranean maquis ecosystem: mass loss, microbial enzyme activities and nutrient changes. Soil Biology and Biochemistry 33, 311-321.
- Florencio, C., Couri, S., Farinas, C.S., 2012. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. Enzyme Research 1-7.
- Fungaro, M.H.P., Maccheroni Jr., W., 2002. Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas à Indústria de Alimentos, in: Melo, I.S., Valadares-Inglis, M.C., Nass, L.L., Valois, A.C.C. (Eds.). Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, pp. 426-453.
- Garlipp, A.B., 1995. Isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo do Banhado Grande, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Dissertação (Mestrado). Rio Claro, UNESP.
- Gorlach-Lira, K., Coutinho, H.D.M., 2007. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 38, 135-141.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial alpha amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry 38, 1599-1616.
- Haichar, F.Z., Santaella, C., Heulin, T., Achouak, W., 2014. Root exudates mediated interactions belowground. Soil Biology and Biochemistry 77, 69-80.
- Holt, J., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., 2004. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v. 2. The Proteobacteria. Williams & Wilkins, Baltimore.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, 2015. Ecossistemas. Caatinga. Disponível: <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/caatinga.htm>. Acesso: 26 mar. 2015.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, 2006. Plano operativo de prevenção e combate aos

- incêndios florestais do Parque Nacional de Ubajara. Ubajara.
- IBDF/FBCN, 1981. Plano de Manejo do Parque Nacional da Tijuca. Brasília.
- ICMBio. Instituto Chico Mendese de Conservação da Biodiversidade Parque Nacional de Ubajara, 2015. Disponível: <http://www.icmbio.gov.br/biodiversidade/unidades-de-conservacao/biomas-brasileiros/caatinga/unidades-de-conservacao-caatinga/636-PNU>. Acesso: 11 mar. 2015.
- Irfan, M., Asma, S., Quratulain, S., Muhammad, N., 2012. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. *Turkish Journal of Biochemistry* 37, 287-293.
- Jaradat, Z., Dawagre, H.A., Ababneh, Q., Saadoun, I., 2008. Influence of culture conditions on cellulase production by *Streptomyces* sp. (Strain J2). *Jordan Journal of Biological Sciences* 1, 141-146.
- Jaralla, E.M., Al-Dabbagh, N.N., Hameed, N.M., Abdul-Hussain, N., 2014. Screening for enzymatic production ability and antimicrobial activity of actinomycetes isolated from soil in Hillah/Iraq. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 9, 42-47.
- Jayasinghe, B.A.T.D., Parkinson, D., 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology* 38, 109-118.
- Jeffrey, L.S.H., Sahilah, A.M.R., Son, R., Tosiah, S., 2007. Isolation and screening of actinomycetes from Malaysian soil for their enzymatic and antimicrobial activities. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* 35, 159-164.
- Joshi, S.R., Sharma, G.D., Mishra, R.R., 1993. Microbial enzyme activities related to litter decomposition near a highway in a sub-tropical forest of North East India. *Soil Biology & Biochemistry* 25, 1763-1770.
- Karanja, E. N., Boga, H.I., Muigai, A.W., Wamunyokoli, F., Kinyua, J., Nonoh, J.O., 2010. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel *Streptomyces* species from Kenyan soils. *Scientific Conference Proceedings* 17-30.
- Kavamura, V.N., 2012. Bactérias associadas as cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico. Tese (Doutorado). Piracicaba, ESALQ.
- Kuhadet, R.C., Gupta, R., Singh, A., 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research* 1-10.
- Kumar, R., Lone, S.A., Ali, S., Pattnaik, S., Kumari, N., Kumar, D., Seenivasan, P.N., 2013. Cellulolytic activity of actinomycetes isolated from Areraj region, Bihar. *Current Discovery* 2, 92-96
- Lewis, K.J., 1988. Biological control mechanism of the mycoparasitae *Phytophthora oligandrum* Dreschler. PhD Thesis. University of Sheffield, Sheffield.
- Lima, L.H.C., De Marco, J.L., Felix, C.R., 1998. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle por micoparasitismo, in: Melo I.S., Azevedo J.L., (Eds.), *Controle Biológico*. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, pp. 263-304.
- Lima, S.M.A., 2013. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTMS-9H isolada da rizosfera de *Paullinia cupana* Kunth. Dissertação (Mestrado). Recife, UFPE.
- Lucena, V.B., Raimam, M.P., Cardoso, N.A., Albino, U.B., 2013. Influência de fungos micorrízicos-arbusculares em paricá (*Schizolobium amazonicum*) cultivado no Estado do Pará, Brazilian. *Pesquisa Florestal Brasileira* 33, 235-241.
- Martins, C.M., Pinheiro, M.S., Fiúza, L.M.C.G., Oliveira, A.V., Martins, S.C.S., 2014. Comunidade microbiana cultivável do solo rizosférico de leguminosas no semiárido brasileiro. *Enciclopédia Biosfera* 10, 2858-2868.
- Minotto, E., Milagre, L.P., Oliveira, M.T., Van Der Sand, S.T., 2014. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants, *Journal of Advanced Scientific Research* 5, 16-23.
- Miyauchi, M.Y.H., 2012. Biocontrole de fungos patogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de em *Microbiologia Agrícola Araucaria angustifolia*. Tese (Doutorado). Piracicaba, ESALQ.
- Mohan, G.M., Charya, M.A.S., 2012. Enzymatic activity of fresh water actinomycetes. *International Research Journal of Pharmacy* 3, 193-197.
- Mohanta, Y.K., 2014. Isolation of cellulose-degrading actinomycetes and evaluation of their cellulolytic potential. *Bioengineering and Bioscience* 2, 1-5.
- Nogueira, E.B.S., Cavalcanti, M.A.Q., 1996. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. *Revista de Microbiologia* 27, 7-9.
- Nunes, T.E.T., 2010. Atividade celulolítica de isolados de actinomicetos oriundos de processo de compostagem frente a diferentes

- temperaturas. Monografia (Curso em Ciências Biológicas). Porto Alegre, UFRGS.
- Núñez-Santiago, M.C., Bello-Pérez, L.A., Tecante, A., 2004. Swelling-solubility characteristics, granule size distribution and rheological behavior of banana (*Musa paradisiacal*) starch. *Carbohydrate Polymers* 56, 65-75.
- Oliveira, A.N., Oliveira, L.A., Andrade, J.S., Chagas Júnior, A.F., 2006. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbio nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26, 853-860.
- Oliveira, A.P.G., Sabino, S.M., Gandine, S.M., Moulin, T., Amaral, A.A., 2014. Importância das actinobactérias em processos ecológicos, industriais e econômicos. *Enciclopédia Biosfera* 18, 3938-3952.
- Prado, D.E., 2003. As caatingas da América do Sul, Seção I. Padrões de diversidade e distribuição de espécies em escala regional. *Ecologia e Conservação da Caatinga*. Editora Universitária, Recife.
- Rao, K.V.R., Kiran, C.H.R., Rao, D.B., Madhavi, Y., Rao, P.K., Rao, T.R., 2012. Antagonistic activities of actinobacteria from mangrove sediment. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4, 364-367.
- Rodrigues, K., 2006. Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. Dissertação (Mestrado). Porto Alegre, UFRGS.
- Ruegger, M. J. S., Tauk-Tornisielo, S. M., 2004. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 27, 205-211.
- Sampathkumar, A.K.S., 2014. Isolation and screening of potent amylase-producing marine actinomycetes from seabed. *Malaya Journal of Biosciences* 1, 273-276.
- Sathya, R., Ushadevi, T., 2014. Industrially important enzymes producing *Streptomyces* species from mangrove sediments. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6, 233-237.
- Semêdo, L.T.A.S., Linhares, A.A., Gomes, R.C., Manfio, G.P., Alviano, C.S., Linhares, L.F., Coelho, R.R., 2001. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. *Microbiological Research* 155, 291-299.
- Sheetal, B., Modi, H.A., 2013. Streptomyces: A storehouse of bioactive compounds and enzymes A: production of glucose isomerase. *Research Journal of Recent Sciences* 2, 330-339.
- Silva, V.M., Martins, C.M., Martins, S.C.S., 2015. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. *Enciclopédia Biosfera* 11, 2026-2036.
- Silva, K., Cassetari, A.S., Lima, A.S., Brandt, E., Pinnock, E., Vandammec, P., Moreira, F.M.S., 2012. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. *Systematic and Applied Microbiology* 35, 253-262.
- Singh, M. J., Padmavathy, D. S., 2014. Comparative screening of enzyme producing endophytic actinomycetes from fresh and fallen leaves of *Embllica officinalis* in Western Ghats. *International Journal of Biological Research* 2, 129-130.
- Soares Jr, F.L., Melo, I.S., Dias, A.C.F., Andreote, F. D., 2012. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 2195-2203.
- Sousa, C.S., Soares, A.C.F., Garrido, M.S., 2008. Caracterização de estreptomicetos com potencial para promoção de crescimento de plantas e biocontrole. *Scientia Agricola* 65, 50-55.
- Stamford, T.L.M., Stamford, N.P., Araujo, J.M., 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L.Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 18, 382-385.
- Velayudham, S., Murungan, K., 2012. Diversity and antibacterial screening of actinomycetes from javadi hill forest soil, Tamilnadu, India. *Journal of Microbiology Research* 2, 41- 46.
- Ventura, M., Canchaya, C., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K.F., Sinderen, D., 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 495-548.
- Vigal, T., Gil, J.A., Daza, A., García-González, M.D., Martín, J.F., 1991. Cloning, characterization and expression of an alpha-amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU3570. *Molecular & General Genetics* 225, 278-288.