



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

KAROLINE ALVES RAMOS

**EFEITO DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE
ACTINOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO**

FORTALEZA

2017

KAROLINE ALVES RAMOS

EFEITO DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE
ACTINOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas do Departamento de Biologia da
Universidade Federal do Ceará como requisito
parcial para a obtenção do Título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Suzana Claudia
Silveira Martins.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R143e Ramos, Karoline Alves.
Efeito de fatores abióticos sobre a atividade enzimática de actinobactérias do semiárido / Karoline Alves Ramos. – 2017.
38 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Suzana Cláudia Silveira Martins.
1. Alterações fisiológicas. 2. Estresse ambiental. 3. Amilase. 4. Solo. I. Título.

CDD 570

KAROLINE ALVES RAMOS

EFEITO DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE
ACTINOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas do Departamento de Biologia da
Universidade Federal do Ceará como requisito
parcial para a obtenção do Título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 11/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Suzana Claudia Silveira Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Vinícius Leite Lima
Universidade Regional do Cariri (URCA)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado sabedoria e não ter permitido que as dificuldades me deixassem desistir.

Aos meus pais, Angelita e José Maria, que me deram todo amor, auxílio e motivação para que eu conseguisse chegar a um curso de graduação e que, finalmente, pudesse me formar nele. Agradeço principalmente pela confiança e apoio em todas as decisões que tomei, inclusive nas mais difíceis.

A professora Suzana, por ser um exemplo de pessoa e de professora, desde as aulas de Microbiologia Geral. Agradeço por ter me despertado a vontade de trabalhar com a Micro e de fazer parte da família LAMAB, além de ter me inspirado a ir para o curso que eu tanto amo.

A família LAMAB, por ter me ajudado grandemente na realização deste trabalho e por todos esses anos maravilhosos que foram compartilhados. Seria injusto aqui citar nomes, pois todos de alguma forma foram importantes nessa caminhada, mas necessito agradecer especialmente a professora Cláudia, Vinicius, Fernando, Juliani e Valéria por sua ajuda, suas palavras de apoio e seus conselhos.

Ao professor Lorenzo e ao pessoal de seu laboratório, por toda sua paciência e tempo disponibilizados com o auxílio no trabalho com o Rstudio.

Ao meu grande amigo Hélio, que mesmo com algumas palavras duras demonstrou todo seu amor e seu apoio a mim. Eu não conseguiria ter terminado este trabalho sem, todos os dias, lembrar-me de suas palavras: “se quer fazer algo dar certo, comece por aquilo que depende de você”.

Por fim, mas não menos importante, a todos os amigos de faculdade, aos que se tornaram amigos da vida, e aos meus amigos irmãos: meu MUITO obrigada. Não só por terem em algum momento me ajudado com alguma palavra de conforto, mas também por terem caminhado comigo até aqui. Eu sou a pessoa que sou hoje devido a todos os erros e acertos que cometi e também porque, como diz uma frase que ouvi um tempo atrás: “aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”.

RESUMO

As actinobactérias constituem um importante grupo microbiano e sua atividade enzimática contribui com a estruturação de comunidades do solo. Nesse contexto, avaliou-se o efeito de fatores abióticos no crescimento e atividade amilolítica de 18 cepas de actinobactérias reconhecidamente facilitadoras de rizóbios isoladas do Parque Nacional de Ubajara – CE, região do semiárido Nordeste Brasileiro. As cepas foram analisadas quanto a capacidade e tolerância para crescer em diferentes faixas e concentrações de pH e salinidade e suas atividades amilolíticas foram registradas nas mesmas condições. Constatou-se que mais de 94% das cepas cresceram nos pHs 4 e 9 e ainda cerca de 83% toleraram a maior condição salina imposta. Em relação à atividade amilolítica, em todos os testes as cepas apresentaram evidente atividade enzimática, exceto no pH 4; e a análise de regressão linear forneceu um gráfico que demonstrou os maiores índices enzimáticos no pH 7 e na concentração de 2% de NaCl. Portanto, a atividade enzimática dessas cepas associada a sua tolerância para crescer demonstrou o potencial dessas actinobactérias em manter os processos biológicos em que estão envolvidas mesmo em condições de estresse fisiológico, características dos solos de regiões semiáridas.

Palavras-chave: Alterações fisiológicas. Estresse ambiental. Amilase. Solo.

ABSTRACT

Actinobacteria constitute an important microbial group and its enzymatic activity contributes to the structuring of soil communities. In this context, the present study tested the effect of abiotic factors on the growth and amylolytic activity of 18 strains of actinobacteria known to facilitate rhizobia isolated from the soil of the Parque Nacional de Ubajara - PNU, a semiarid region of the Northeast of Brazil. The strains were evaluated for capacity and tolerance to grow in different ranges and concentrations of pH and salinity as well as their amylolytic activity that was tested under the same conditions. It was found that more than 94% of the strains grew at pHs 4 and 9 and approximately 83% tolerated the most saline condition imposed. According to the amylolytic activity, the strains showed enzymatic activity, except at pH 4; linear regression analysis provided a plot showing the highest enzyme production indexes at pH 7 and 2% NaCl concentration. Therefore, the enzymatic activity of these actinobacteria associated with their tolerance to grow under abiotic stress have demonstrated the potential of these bacteria in maintaining the biological processes in the soil, even under conditions of physiological stress, which are typical characteristics of the soils of semiarid regions.

Keywords: Physiological alterations. Environmental stress. Amylase. Soil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Semiárido.....	9
2.2 Rizosfera.....	10
2.3 Actinobactérias.....	11
2.4 Atividade amilolítica.....	12
3 OBJETIVOS.....	14
3.1. Geral.....	14
3.2. Específicos.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Área de estudo.....	15
4.2 Actinobactérias.....	16
4.3 Caracterização fisiológica das cepas de actinobactérias compatíveis com rizóbios.....	16
4.3.1 Capacidade de crescer em diferentes pHs.....	16
4.3.2 Tolerância à salinidade.....	16
4.4 Efeito do pH e salinidade sobre a atividade enzimática das cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com rizóbios.....	17
4.4.1 Atividade amilolítica.....	17
4.4.1.1 pH.....	17
4.4.1.2 Concentrações salinas.....	17
4.4.2 Índice Enzimático.....	17
4.4.3 Análises estatísticas.....	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1 Caracterização fisiológica.....	18
5.1.1 Capacidade de crescer em diferentes pHs.....	18
5.1.2 Tolerância à salinidade.....	20

5.2 Efeito do pH e salinidade sobre a atividade enzimática das cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com rizóbios	22
5.2.1 pH.....	22
5.2.2 Concentrações salinas	25
5.2.3 Análises estatísticas.....	28
6 CONCLUSÃO.....	30
PERSPECTIVAS FUTURAS	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

A região semiárida se caracteriza por solos com baixa disponibilidade de nutrientes e elevadas concentrações salinas (ZANELLA, 2014, FREITAS *et al.*, 2007). A diversidade de vegetações, clima quente e seco, amplitudes térmicas elevadas e pouca umidade do solo também predominam nessa região (KAVAMURA *et al.*, 2013). Essas características configuram um ambiente estressante para os organismos em geral e, em particular, para os microrganismos. No entanto, a literatura destaca que as actinobactérias constituem um grupo microbiano abundante e diverso no solo destas regiões (PINHEIRO *et al.*, 2014; BRITO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015a).

A diversidade metabólica das actinobactérias é um dos fatores que possibilita o crescimento e sobrevivência desse grupo nos mais diferentes e estressantes ambientes, como regiões do semiárido (SUNEETHA; KARTHICK; PRATHUSHA, 2011; MANSOUR; ABDEL-AZEEM; ABO-DERAZ, 2015). Acredita-se que os produtos do metabolismo secundário dessas bactérias desempenhem papel relevante para a manutenção vegetal e microbiana do solo (GONZÁLEZ *et al.*, 2005). Alguns autores, como Bais *et al.* (2006), destacam a importância das actinobactérias na rizosfera, região do solo influenciada pelas raízes que produzem diferentes exsudatos que favorecem a atividade e diversidade microbiana nessa área (DANTAS *et al.*, 2009).

Entre os metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias estão as enzimas extracelulares, que hidrolisam macromoléculas complexas, disponibilizando energia e nutrientes necessários, para entre outras funções, as interações metabólicas entre organismos do solo (EL-TARABILY *et al.*, 2009; PALANIYANDI, 2014; PANDE *et al.*, 2014). Essa atividade enzimática é influenciada por diversos fatores, tais como pH, temperatura, salinidade, sendo todos estes parâmetros fisiológicos muito variáveis em solos rizosférico, principalmente da região do semiárido (PADILHA, 1998; GUPTA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2010).

Tendo em conta que um dos substratos mais abundantes no solo é o amido, polissacarídeo complexo, degradado pelas amilases (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003), estudos sobre a influência de fatores abióticos na atividade amilolítica de actinobactérias do semiárido podem contribuir para compreensão desse ecossistema tão importante e ainda pouco estudado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Semiárido

A região semiárida abrange uma área de aproximadamente 970 mil km², o que corresponde a 90% do território Nordestino, além da região setentrional de Minas Gerais (SILVA, 2006). Cerca de 800 mil km² é coberto pela Caatinga (IBAMA, 2006). Esse domínio apresenta precipitações irregulares, períodos de seca, solos rasos e ecossistemas xerófilos (ALVES *et al.*, 2006, LIMA *et al.*, 2012). Cerca de 70% de sua área está sujeita ao antropismo, devido o desmatamento e outros usos inadequados dos recursos, aumentando o avanço da degradação desse ambiente, e assim, o semiárido passa por um acentuado processo de desertificação (PACHECO *et al.*, 2014).

O semiárido configura-se como uma região com grande diversidade de ambientes, em que é possível observar heterogeneidade de vegetações, clima quente e seco, plantas que se adaptam bem a diversas condições ambientais, além de amplitudes térmicas elevadas e solos pouco úmidos (KAVAMURA *et al.*, 2013). Gorlach-Lira e Coutinho (2007) descreveram que os microrganismos no solo são influenciados por diversos fatores químicos e físicos, que incluem a disponibilidade de nutrientes, matéria orgânica, umidade e temperatura do solo, dessa forma, em ambientes áridos, todos esses fatores são geralmente desfavoráveis para o crescimento microbiano.

Os solos das regiões semiáridas apresentam baixa disponibilidade de nutrientes e condições abióticas limitantes, como intensa radiação solar, baixos índices pluviométricos e elevadas temperaturas (ZANELLA, 2014), além disso, em regiões semiáridas, há grande acúmulo de sais, o que leva à degradação do solo (FREITAS *et al.*, 2007). A escassez de chuva tem como consequência um solo pouco desenvolvido, com processos químicos mitigados (ARAÚJO, 2011). Dessa forma, pode-se inferir que a atividade microbiana nos solos dessa região tem grande importância nos processos biológicos e bioquímicos, pois interfere diretamente na transformação e disponibilização de nutrientes (VINHAL-FREITAS *et al.*, 2010). Assim, apesar das condições estressantes da região semiárida também influenciarem negativamente o desenvolvimento de populações microbianas, alguns microrganismos, como as actinobactérias constituem um grupo representativo em termos de riqueza e diversidade nos solos destas regiões (LIMA *et al.*, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015a).

2.2 Rizosfera

A rizosfera é definida por Bais *et al.* (2006) como o compartimento do solo marcado pela presença de raízes no qual ocorrem processos biológicos complexos, além disso é descrita por Uren (2000) como gradientes longitudinais e radiais que ocorrem com a expansão do crescimento radicular, nutrientes e absorção de água, exsudação e subsequente desenvolvimento de microbiota associada, dentre outros organismos. Dessa forma, considera-se a rizosfera como um ambiente com ampla presença de interações tanto entre as raízes das mais diversas plantas quanto dessas raízes com microrganismos e invertebrados (HIRSCH *et al.*, 2003). Essas interações podem ser classificadas como positivas e negativas, sendo os fatores que as determinam ainda pouco estudados, porém os exsudatos radiculares parecem ter um importante papel na assinatura química que determina essas interações e, assim, na dinâmica da comunidade vegetal, microbiana e do próprio solo (BAIS *et al.*, 2006).

No solo, as comunidades microbianas representam o maior reservatório de diversidade biológica conhecida no mundo (BERENDSEN, 2013), nesse contexto temos que a rizosfera pode conter até 10^{11} células microbianas por grama de raiz (EGAMBERDIEVA *et al.*, 2008) e cerca de 30 mil espécies procarióticas (MENDES *et al.*, 2011). Entre os exsudatos liberados na rizosfera destacam-se íons, enzimas, além de diferentes metabólitos primários e secundários que contém carbono na sua composição (BERTIN *et al.*, 2013; JESUS, 2013). Referidas substâncias garantem um ambiente especializado que possibilita a sobrevivência e permanência da diversidade microbiana (DANTAS *et al.*, 2009), possibilita as interações físicas e biológicas (UREN, 2000; HIRSCH *et al.*, 2003) e geram impactos ecológicos cruciais na macro e microbiota do solo (BERTIN *et al.*, 2013).

As características do solo também afetam a diversidade microbiana e a dinâmica dos ciclos de nutrientes. Por exemplo, na rizosfera, além da disponibilidade de nutrientes, o solo sofre alterações de pH pela ação bioquímica das raízes (SOUZA *et al.*, 2010), ambos fatores críticos na composição das comunidades bacterianas do solo (GRIFFITHS *et al.*, 2011; KURAMAE *et al.*, 2012).

Portanto, a colonização por microrganismos e suas interações com plantas (ZAGO; DE-POLLI; RUMJANEK, 2011) e outros grupos microbianos (JESUS, 2013) é evidente em solos rizosféricos, e contribuem para obtenção e utilização eficiente de um substrato rico e seletivo (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

2.3 Actinobactérias

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, filamentosas e esporulantes que contém um teor de 55 a 75% de Guanina e Citosina em seu DNA (VENTURA *et al.*, 2007; ASHOKVARDHAN *et al.*, 2014; BARKA *et al.*, 2016).

Constitui um dos maiores grupos microbianos e está distribuído nos mais diversos ecossistemas aquáticos e terrestres, porém de modo mais abundante em solos (OSKAY; USAME; CEM, 2004; SILVA *et al.*, 2012; LIMA, 2013), especialmente naqueles alcalinos e ricos em matéria orgânica, onde constituem uma parte importante da população microbiana (LIMA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015a). Nesses ambientes podem ser encontrados em sua superfície e em até profundidades de dois metros abaixo do solo (BARKA *et al.*, 2016).

Embora abundante no solo, fatores tais como a temperatura, pH, umidade do solo, localização geográfica e matéria orgânica influenciam o crescimento das actinobactérias (ARIFUZZAMAN *et al.*, 2010; BARKA *et al.*, 2016). Nesse sentido, destaca-se que esse grupo bacteriano apresenta capacidade adaptativa a condições ambientais hostis e são capazes de colonizar a rizosfera (BERNARDES; SANTOS, 2006).

As actinobactérias tem ampla diversidade morfológica e diferem principalmente na apresentação de micélio de diferentes cores, tanto vegetativo quanto aéreo, na produção de pigmentos carotenóides e melanoídes difusíveis e perceptíveis em meio de cultura bem como na presença e aparência dos seus esporos (BARKA *et al.*, 2016).

Essas bactérias se destacam ainda pela atividade metabólica com a produção de diferentes metabólitos secundários de importância química para o solo e com potencial biotecnológico. Sugere-se relevância desse grupo para a manutenção, sinalização e colonização de diversos ambientes (GONZÁLEZ, 2005). Dentre os metabólitos secundários produzidos por actinobactérias estão as enzimas extracelulares (VENTURA *et al.*, 2007; DURAI PANDIYAN *et al.*, 2010), como as celulases, proteases, amilases, xilanases, quitinases, e os antibióticos (GAO; GUPTA, 2012; BOUIZGARNE; AOUAMAR, 2014). A produção de metabólitos secundários em diferentes ecossistemas é, pois, uma característica marcante das actinobactérias (MANGAMURI *et al.*, 2012; MANIVASAGAN *et al.*, 2010; ARIFUZZAMAN *et al.*, 2010, RAMESH; MATHIVANAN, 2009).

O gênero *Streptomyces* é o principal representante das actinobactérias, sendo 95% das cepas de actinobactérias isoladas do solo (WILLIAMS; VICKERS, 1988; SEMÊDO *et al.*, 2001), onde hidrolisam polissacarídeos e outras macromoléculas naturais importantes para a ecologia do solo (CHATER *et al.*, 2010). O potencial enzimático desse gênero também é reconhecido em pesquisas de aplicação biotecnológica e na agricultura (GUPTA *et al.*, 2003, PALANIYANDI *et al.*, 2014).

Entre as enzimas extracelulares produzidas pelas actinobactérias destaca-se a amilase que auxilia na sobrevivência de plantas, no controle de patógenos e disponibiliza nutrientes que facilitam a permanência no solo de outros grupos microbianos (EL-TARABILY *et al.*, 2009; PALANIYANDI *et al.*, 2014; PANDE *et al.*, 2014). Como exemplo desse processo interativo, é possível destacar a participação das actinobactérias no processo de fixação biológica do nitrogênio realizado pelos rizóbios. Referido processo demanda energia, obtida pela degradação microbiana de macromoléculas orgânicas complexas, como o amido, que, embora presente no solo, pode não ser imediatamente acessível aos rizóbios. Nesse sentido, as actinobactérias por sua versatilidade enzimática, podem degradar referida substância e contribuir no suprimento energético necessário à fixação biológica de nitrogênio (JESUS, 2013).

Tendo em vista que a atividade da amilase é afetada pelos fatores abióticos extremos, como são as condições ambientais prevalentes no semiárido, é importante determinar em que valores essa atividade ainda é detectada.

2.4 Atividade amilolítica

O amido é um homopolissacarídeo neutro com dois tipos de polímeros em sua molécula: amilose e amilopectina, que são diferenciados por suas propriedades físicas (BOBBIO; BOBBIO, 1992). Considerado como uma das maiores porções de carbono presentes no solo, o amido é o mais abundante composto orgânico do mundo, representando cerca de metade do carbono orgânico da biosfera (FLORENCIO; COURI; FARINAS *et al.*, 2012). Pode ser amplamente encontrado na natureza, principalmente em sementes, tubérculos ou raízes e também em muitos produtos agrícolas, além de ser uma importante reserva de nutrição para plantas superiores (MORAES, 2004; NUNEZ-SANTIAGO; BELLO-PEREZ; TECANTE, 2004).

De acordo com Lehninger *et al.* (2006), as enzimas são catalisadoras de reações dos

sistemas biológicos, aumentando a velocidade dessas reações, apresentando alto grau de especificidade por seus substratos. A velocidade das reações enzimáticas depende da concentração do substrato e de fatores abióticos, tais como temperatura, pH e salinidade do solo. Por sua disponibilidade, o amido é um dos principais substratos nos processos de ciclagem de nutrientes (JOSHI *et al.*, 1993; FIORRETO *et al.*, 2001).

As amilases constituem um grupo de enzimas que hidrolisam o amido, um dos mais importantes polissacarídeos de reserva do reino vegetal (GUPTA *et al.*, 2003), e representam cerca de 30% da produção de enzimas do mundo (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002). Em seu trabalho, Gupta *et al.* (2003) diferencia as amilases em duas categorias: as endoamilases e as exoamilases, sendo as primeiras catalisadoras de hidrólises aleatórias no interior da molécula de amido e as exoamilases catalisadoras de hidrólises de ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula.

As amilases são as mais antigas enzimas utilizadas nas indústrias e podem ser derivadas das mais diversas fontes, como animal, vegetal e de microrganismos. As enzimas do solo são predominantemente de origem microbiana (INSAM, 2001), desse modo, microrganismos que produzem essas enzimas influenciam nas propriedades químicas e físicas do solo, além da disponibilidade de nutrientes para outros microrganismos e espécies vegetais (JEFFREY *et al.*, 2007; ALLISON *et al.*, 2007).

Em geral, enzimas produzidas a partir de fontes microbianas (fungos e bactérias) são as mais comuns devido a produção em larga escala (GUPTA *et al.*, 2003), tendo muitas aplicações nas indústrias, como descrito na revisão de Aiyer (2005). Essa produção em larga escala contribui para que a amilase seja a enzima comercial de maior destaque, com aplicações no processamento e produção de alimentos e bebidas, bem como na área têxtil e farmacêutica (SUMRIN *et al.*, 2011).

A literatura relata que as cepas bacterianas dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e do gênero *Streptomyces* oriundas do solo são as mais utilizadas para síntese da amilase (AKOND *et al.*, 2016; GEBREYOHANNES, 2015; KAFILZADEH *et al.*, 2012; SUMRIN *et al.*, 2011; OYELEKE *et al.*, 2010; MANIVASAGAN *et al.*, 2010). No entanto, Tonkova *et al.* (1993); Kathiresan e Manivannan (2006), reportaram o isolamento de microrganismos capazes de degradar o amido isolados de outros habitats.

A atividade enzimática dos microrganismos revela a sua capacidade de degradar

compostos e pode ser avaliada pelo índice de atividade enzimática (IE), que é o parâmetro semiquantitativo mais utilizado para essa finalidade. Esse IE permite a seleção e comparação de microrganismos considerados produtores de enzimas, pois realiza a correlação direta entre o diâmetro do halo de degradação e a habilidade degradativa desses microrganismos (LIN *et al.*, 1991; FUNGARO *et al.*, 2002).

A estabilidade enzimática varia com as condições ambientais, o que mostra a importância do controle desses parâmetros em processos industriais (PADILHA, 1998). A temperatura, a concentração do substrato e a faixa de pH são os fatores mais importantes na produção enzimática por microrganismos (GUPTA *et al.*, 2003; SUDHARHSAN *et al.* 2007). Segundo Gupta *et al.* (2003), o pH do meio de crescimento, além de interferir na atividade enzimática, induz alterações morfológicas nas cepas. Sudharhsan *et al.* (2007) reforçaram que ocorrendo alterações em condições físicas e químicas, tanto há influência na atividade enzimática quanto também no número de microrganismos, fato comprovado por Sanomiya e Nahas (2003), que detectaram uma redução na frequência de bactérias amilolíticas do solo em função de diferentes pHs.

No solo, a salinidade pode configurar uma ameaça às comunidades microbianas, pois interfere na liberação de compostos solúveis na água e limita a capacidade metabólica dos microrganismos (FREITAS, 2016). Segundo Oshone; Mansour; Tisa (2013), o estresse salino afeta as atividades enzimáticas e metabólicas, enquanto Palaniyandi *et al.* (2014), no estudo com *Streptomyces sp.* como promotor de crescimento em plantas de cultivo, observou que as cepas desse gênero foram capazes de crescer em altas concentrações salinas.

Tendo em vista o papel ecológico que as actinobactérias desempenham no solo e a influência dos fatores abióticos nas atividades desse grupo bacteriano, estudos que contribuam para compreensão desses processos são cruciais para manutenção e recuperação de ecossistemas extremos, como os solos de regiões do semiárido.

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o efeito de fatores abióticos na atividade enzimática de actinobactérias facilitadoras do crescimento de rizóbios oriundas de solo rizosférico de região semiárida.

3.2. Específicos

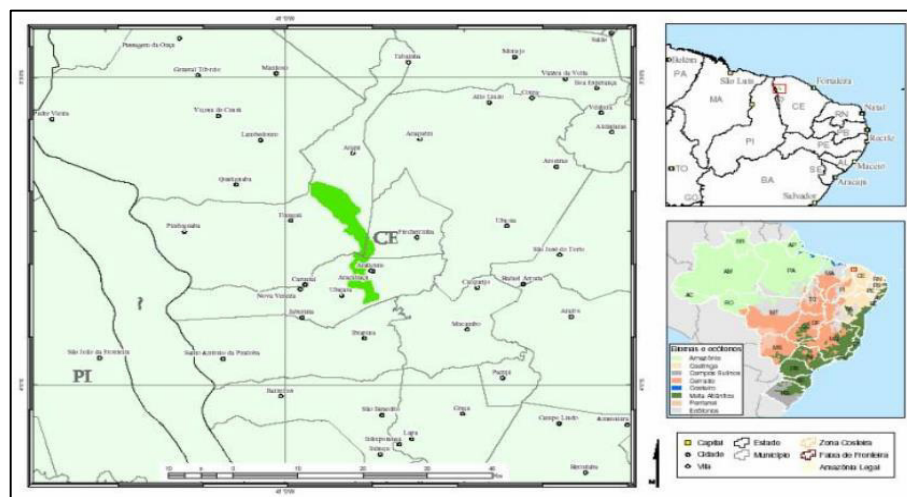
- a) Avaliar a capacidade de crescimento das referidas cepas em diferentes pHs e concentrações salinas;
- b) Avaliar o efeito dos diferentes pHs e concentrações salinas na atividade amilolítica de actinobactérias que interagem positivamente com rizóbios;
- c) Determinar o índice enzimático (IE) de amilase de actinobactérias em diferentes condições abióticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Nesse estudo foram avaliadas actinobactérias isoladas a partir de amostras de solo rizosférico do Parque Nacional de Ubajara (PNU), classificada como unidade de conservação que se localiza no Planalto da Ibiapaba, ao norte do Estado do Ceará a 320 km de Fortaleza, limitando-se com o Estado do Piauí (Figura 1). O PNU está compreendido entre a latitude 3°46'S e longitude 40°54'W com altitudes que variam de 800 a 1.100 m (CUNHA; ARAÚJO, 2014). A temperatura média é de 20 a 22°C no planalto da Ibiapaba e em torno de 24 a 26°C na depressão periférica, tendo sua média pluviométrica em torno de 1.463 mm por ano (IBAMA, 2006).

Figura 1 – Localização geográfica do Parque Nacional e Ubajara (PNU) no Estado do Ceará, Brasil.



Fonte: <http://www.ibama.gov.br/>.

4.2 Actinobactérias

A partir das amostras de solo rizosférico foram isoladas 28 cepas de actinobactérias caracterizadas culturalmente por Ramos *et al.* (2015) e micromorfológicamente por Brito *et al.* (2015). Essas cepas foram denominadas com código (UB-número da cepa). A atividade amilolítica dessas cepas foi previamente avaliada, o Índice Enzimático (IE) estabelecido e aquelas com $IE \geq 2,0$ foram testadas quanto atividade sinérgica com cepas de rizóbios isoladas da mesma área, mas deficientes na produção de amilase (SILVA, 2016). As cepas de actinobactérias UB-02, UB-03, UB-04, UB-05, UB-07, UB-08, UB-11, UB-14, UB-15, UB-17, UB-18, UB-19, UB-20, UB-21, UB-23, UB-24, UB-26 e UB-27 metabolicamente compatíveis com as de rizóbios foram selecionadas para o presente estudo. Essas cepas são 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, compondo coleção de actinobactérias oriundas do semiárido do Nordeste brasileiro.

4.3 Caracterização fisiológica das cepas de actinobactérias compatíveis com rizóbios

4.3.1 Capacidade de crescer em diferentes pHs

Esse teste foi realizado em meio CDA, com a seguinte composição para 1000 mL: K_2HPO_4 (0,5 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g), glicose (10 g), caseína (0,2 g) e nistatina (0,05 mg) (KUSTER; WILLIAMS, 1964, ARIFUZZAMAN *et al.*, 2010). O pH do meio foi ajustado para 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e foram preparadas triplicatas para cada cepa. As cepas foram inoculadas em estrias e após 12 dias de incubação em B.O.D. a $28 \pm 2^\circ C$, o crescimento dessas actinobactérias foi registrado em termos de presença e ausência de crescimento (KISHORE, 2011, modificado).

4.3.2 Tolerância à salinidade

Foram adicionadas as concentrações de NaCl (cloreto de sódio) (0%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% e 3,5%) em meio 5339, com a seguinte composição para 1000 mL: caseína peptonada (10,0 g), extrato de levedura (5,0 g), ágar (20,0 g) e pH 7,0 (WINK, 2012, modificado). Esse teste foi realizado em quadruplicata com duas repetições e as cepas inoculadas em estrias nas concentrações de NaCl especificadas foram incubadas em B.O.D. a

28 ± 2°C durante 7-15 dias. A tolerância dessas actinobactérias ao NaCl foi registrada quanto a presença ou ausência de crescimento.

4.4 Efeito do pH e salinidade sobre a atividade enzimática das cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com rizóbios

As cepas de actinobactérias foram testadas quanto à capacidade de crescimento em meios de cultura contendo amido, com alterações dos padrões abióticos pH e salinidade.

4.4.1 Atividade amilolítica

O efeito dos fatores abióticos pH (4, 5, 7 e 9) e salinidade (1,0, 2,0, 3,0 e 4,0% de NaCl) sobre a atividade amilolítica das cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com cepas de rizóbios foi avaliado segundo a metodologia de Alariya *et al.* (2013). Nesta técnica, as cepas de actinobactérias selecionadas foram inoculadas na forma de *spots* e em triplicata no meio de cultura ágar-amido, com a seguinte composição por litro: peptona (10,0 g), extrato de carne (3,0 g), NaCl (5,0 g), amido solúvel (2,0 g) e ágar (15,0 g).

4.4.1.1 pH

Para testar o efeito do pH as cepas foram incubadas em câmara de crescimento B.O.D. a 28 ± 2°C por 10 dias, em meio de cultura ágar-amido que teve seu pH ajustado para 4, 5, 7 e 9 (ALARIYA *et al.*, 2013, modificado).

4.4.1.2 Concentrações salinas

Para o referido teste o meio ágar-amido teve sua concentração de NaCl ajustada para 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0%. As cepas foram inoculadas em cada concentração anteriormente citadas e incubadas em câmara B.O.D. a 28 ± 2°C por 10 dias, mantendo o pH 6,5-7,1 (ALARIYA *et al.*, 2013, modificado).

4.4.2 Índice Enzimático

A atividade amilolítica em todos os pHs e salinidades testados foi expressa como índice enzimático (IE), que foi determinado utilizando-se a seguinte equação: $IE = Dh/Dc$. Sendo Dh o diâmetro médio em mm do halo de hidrólise e Dc o diâmetro médio em mm da colônia das actinobactérias (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

4.4.3 Análises estatísticas

Para a atividade enzimática foi realizado um ensaio em triplicata, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, em que foi obtido um IE médio, além do desvio padrão. Os dados de índice enzimático foram submetidos a uma análise de regressão linear no software gratuito RStudio[®] (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), com 5% de significância. Essa análise foi utilizada para modelar a relação entre as variáveis quantitativas.

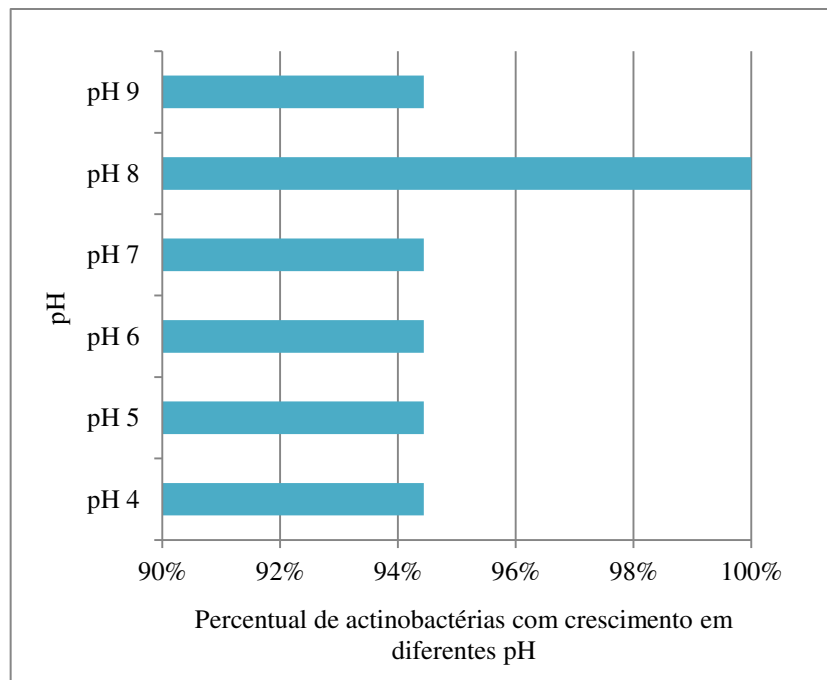
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização fisiológica

5.1.1 Capacidade de crescer em diferentes pHs

Todas as cepas de actinobactérias cresceram no pH 8 e ainda 94,44% cresceram nos pHs 4, 5, 6, 7 e 9 (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Percentual de crescimento de cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com rizóbios em diferentes pHs.

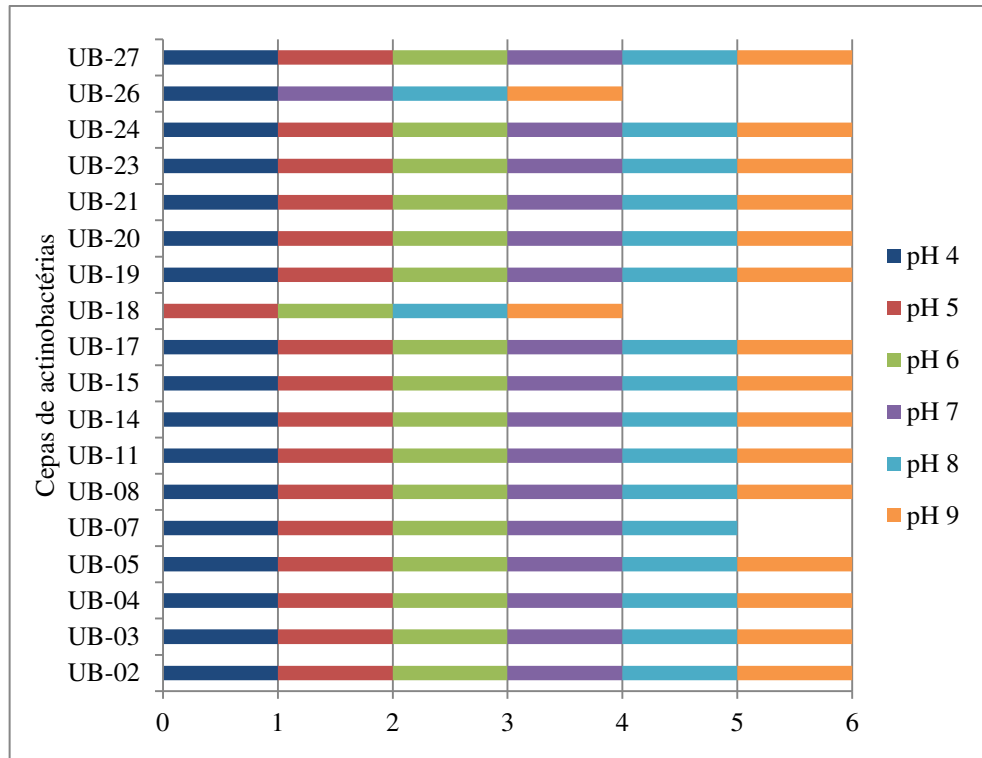


Fonte: acervo do autor.

Com exceção das cepas UB-07, UB-18 e UB-26, as demais (83%) apresentaram o mesmo perfil em relação ao crescimento nos pHs avaliados. A cepa UB-18 foi a única que

não cresceu em pH 7,0. É relevante destacar que a cepa UB-18 cresceu em pHs ácidos (pH 5 e 6) e a UB-26 apresentou crescimento nos pHs mais extremos (4 e 9) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Perfil de crescimento das cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com rizóbios em diferentes pHs.



Fonte: acervo do autor.

Segundo Souza *et al.* (2010), em seu estudo sobre o pH da rizosfera, essa região é muito suscetível a variações de pH, justamente devido aos processos de respiração da raiz e liberação de exsudatos de baixa massa molecular. Em relação ao efeito desses fatores no solo, Akond *et al.* (2016) reforçaram a importância que a temperatura, o pH e a salinidade exercem sobre o crescimento e metabolismo dos microrganismos. Esses autores constataram que o crescimento e a sobrevivência das bactérias ocorreu entre os pHs 4 e 9, com o melhor na faixa de 6,5 a 7,5, como observado para a maioria das cepas de actinobactérias no presente estudo.

No seu estudo sobre actinobactérias na Estação Ecológica de Aiuaba – CE, Lima *et al.* (2017) constataram que as cepas dos dois gêneros de actinobactérias testados (*Streptomyces* e *Saccharothrix*) tiveram comportamentos diferentes em todos os pHs, porém nos pH 7,0 e 8,0 todas apresentaram crescimento. Ressalte-se que embora as cepas estudadas também sejam oriundas de uma região do semiárido (Aiuaba) é possível que o solo apresente características

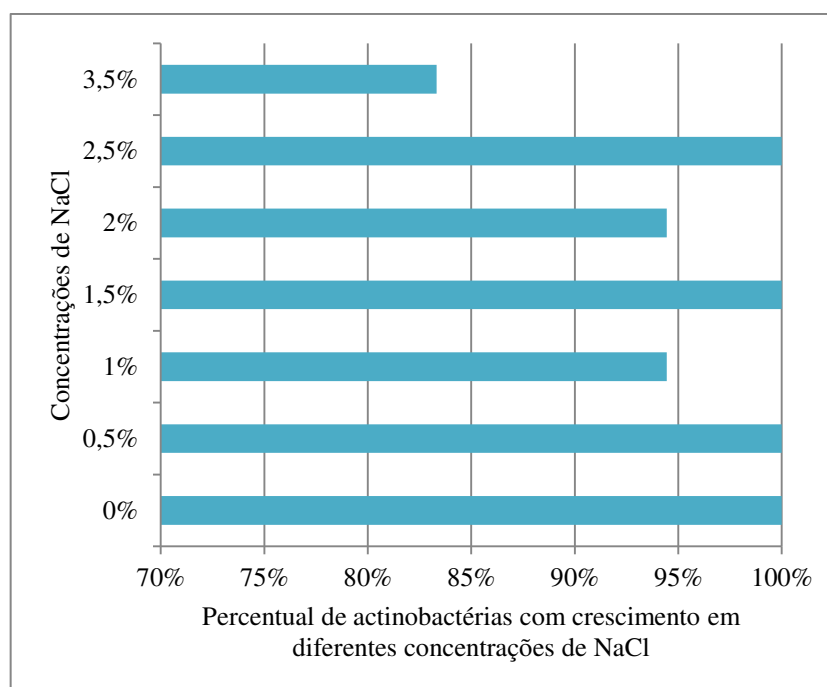
diferentes em relação ao solo do PNU. Importante destacar que nesse estudo os autores registraram que 71% das cepas cresceram em todos os pHs.

Outros trabalhos revelam o potencial desse grupo microbiano em se desenvolver em regiões com solos muito ácidos (ZENOVA; MANUCHAROVA; ZVYAGINTSEV, 2011) e bastante alcalinos (SHIVLATA; SATYANARAYANA, 2015). Dessa forma, os resultados do presente estudo, demonstram que as actinobactérias apresentaram um perfil fisiológico compatível com ambientes em condições de estresse.

5.1.2 Tolerância à salinidade

Todas as cepas de actinobactérias cresceram na ausência de NaCl e também nas concentrações de 0,5%, 2%, 1,5% e 2,5%. Importante ressaltar que 83,3% continuaram apresentando crescimento em uma concentração salina de 3,5% (Gráfico 3).

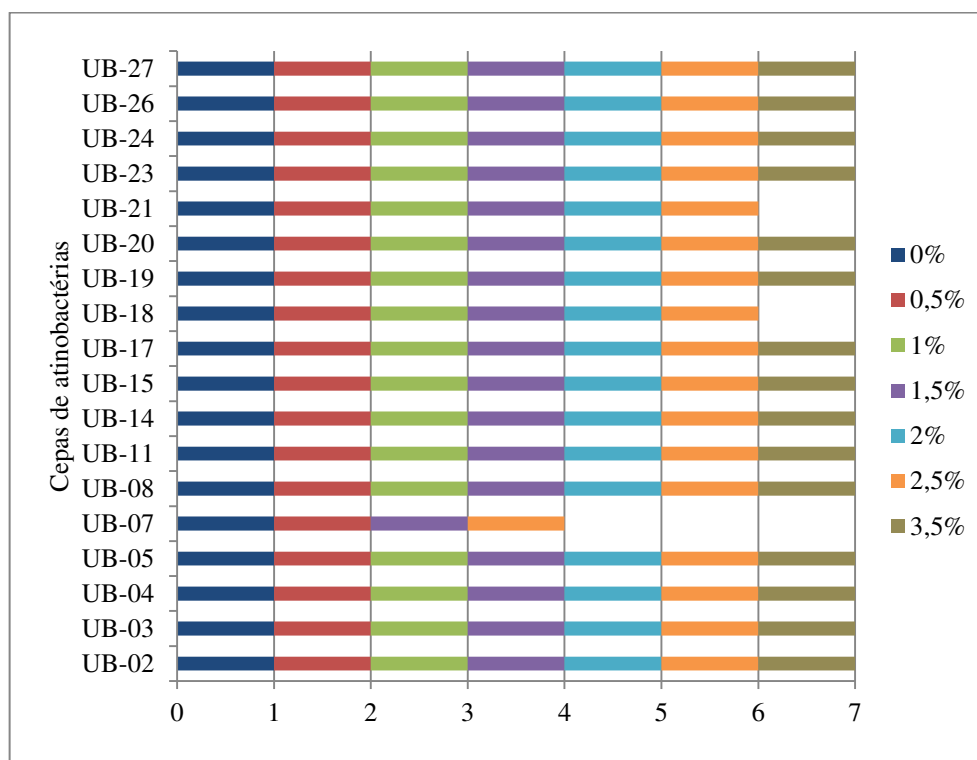
Gráfico 3 – Percentual de crescimento de cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com rizóbios em diferentes concentrações de NaCl.



Fonte: acervo do autor.

Assim como foi detectado para os testes de pH, as cepas UB-07 e UB-18, além da UB-21, não cresceram em todas as concentrações, sendo que as duas últimas não se desenvolveram somente na maior concentração de NaCl (3,5%) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Perfil de crescimento das cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com rizóbios em diferentes concentrações salinas.



Fonte: acervo do autor.

Em seu trabalho com actinobactérias de material de compostagem, Akond *et al.* (2016) consideraram esses microrganismos como capazes de resistir a salinidade, ou seja, a uma tensão halotolerante, pois constataram que até nas concentrações de 8% de NaCl foi observado crescimento acentuado. Dessa forma, podemos considerar que, no presente estudo, as actinobactérias testadas apresentam certo nível de halotolerância, pois cerca de 83% das cepas de actinobactérias cresceram na concentração de 3,5% de NaCl, que foi o maior gradiente testado.

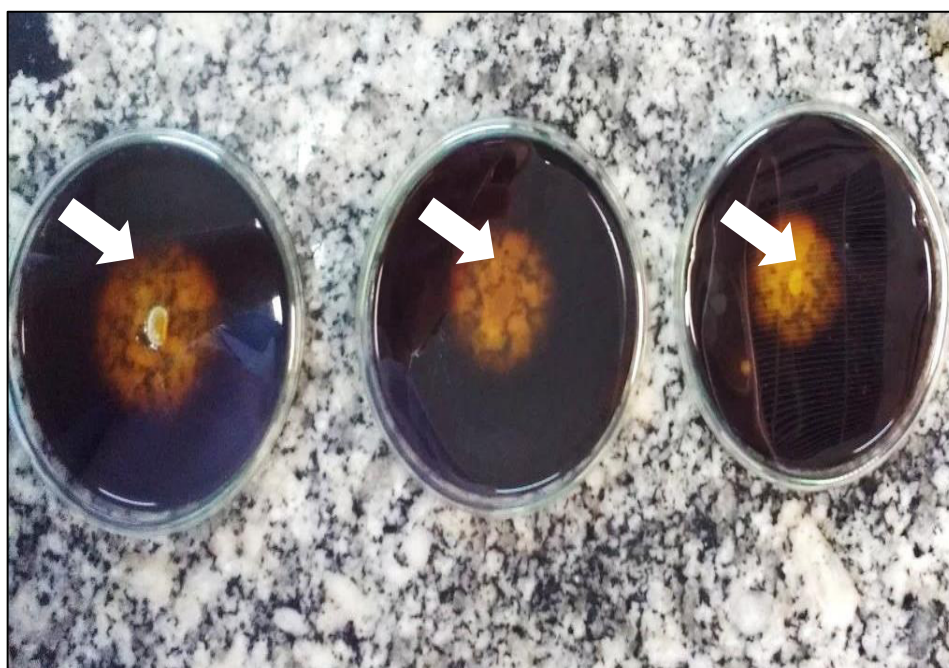
Segundo Goel *et al.* (2012), as restrições ambientais tem como consequência a limitação da distribuição de microrganismos, porém ao demonstrando esse amplo perfil fisiológico, as actinobactérias supostamente passaram por um processo adaptativo, aumentando assim sua capacidade de sobreviver e se manter nesse ambiente extremo. Inclusive, tendo que os solos semiáridos são caracteristicamente salinos (OSHONE; MANSOUR; TISA, 2013), o comportamento dessas actinobactérias demonstrou a facilidade que esses microrganismos possuem nos mais diversos ambientes (SHIVLATA;

SATYANARAYANA, 2015) e a possível importância desse grupo na constituição microbiana dos solos da região do PNU.

5.2 Efeito do pH e salinidade sobre a atividade enzimática das cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com rizóbios

As cepas de actinobactérias apresentaram evidente desempenho na hidrólise de amido, mesmo sob as condições extremas de pH e salinidade avaliadas, como exemplificado na Figura 2, na qual a cepa UB-11 apresentou o halo de degradação do amido bem evidente nas placas do teste de salinidade para a concentração de 1% de NaCl.

Figura 2 – Atividade amilolítica da cepa UB-11 no teste com NaCl 1%. As setas nas zonas claras ao redor da colônia indicam o halo de degradação, relativo à atividade amilolítica da actinobactéria.

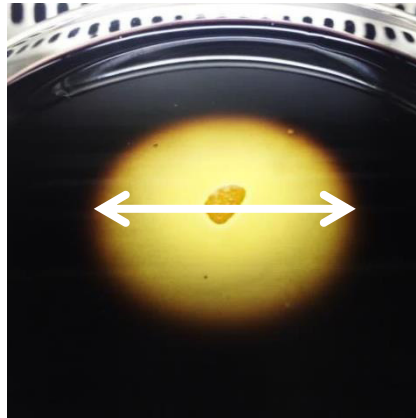


Fonte: acervo do autor.

5.2.1 pH

Das 18 cepas de actinobactérias testadas quanto a capacidade de degradação dos compostos amilolíticos nos diferentes pHs, nenhuma cepa de actinobactéria se desenvolveu no meio suplementado com amido no pH 4, dessa forma não foi possível calcular o índice enzimático. Já no pH 5, 6 cepas (33,33%) foram capazes de crescer e apresentar amilase positiva, com valores do índice enzimático na faixa de $1,5 > IE < 5$. Nesse pH foi possível registrar que a cepa UB-20 apresentou o maior halo de hidrólise (30,68 mm) (Figura 3).

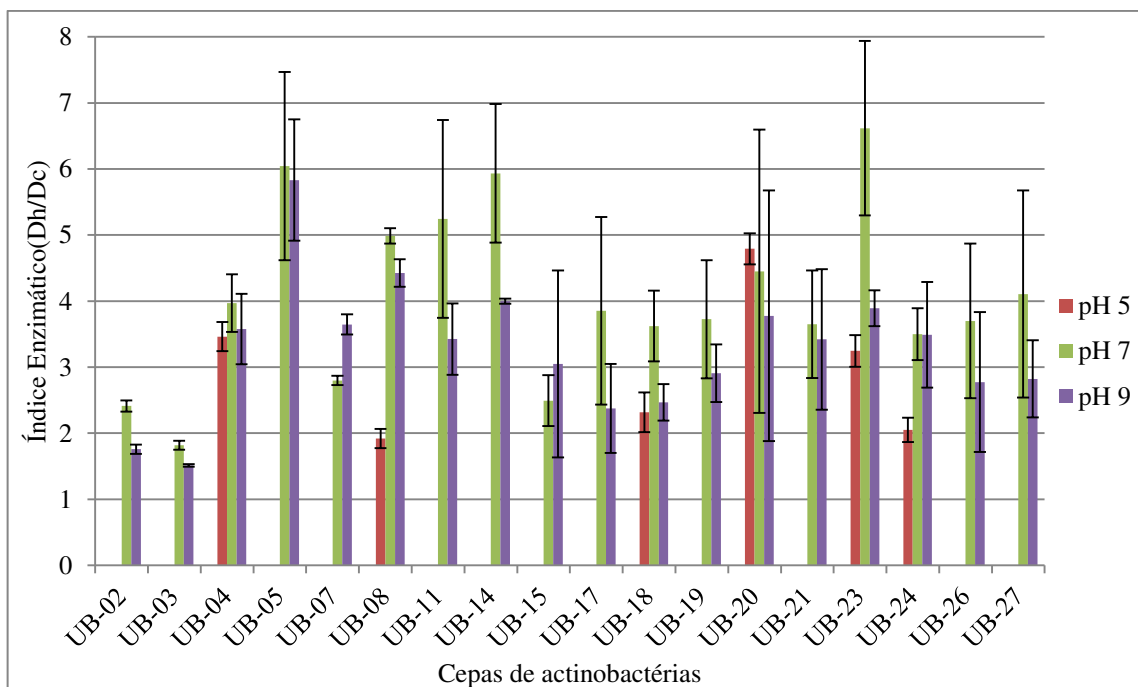
Figura 3 – Halo de hidrólise pela amilase da cepa UB-20 no pH 5. A seta dupla indica o diâmetro do halo.



Fonte: acervo do autor.

Nos pHs 7 e 9 todas as cepas apresentaram amilase positiva, destacando-se as cepas UB-23, com um índice enzimático maior que 6 no pH 7, e as cepas UB-05 e UB-08, com valor maior que 4, mesmo com o aumento do pH. Além disso, é possível observar que o índice enzimático nos diferentes pH variou de 1,5 a 6,7, sendo o menor IE registrado no pH 9 e o maior IE no pH 7 (Gráfico 5), podendo esse maior IE ser atribuído ao pH ótimo de crescimento das actinobactérias ser na faixa de neutralidade (BARKA *et al.*, 2016).

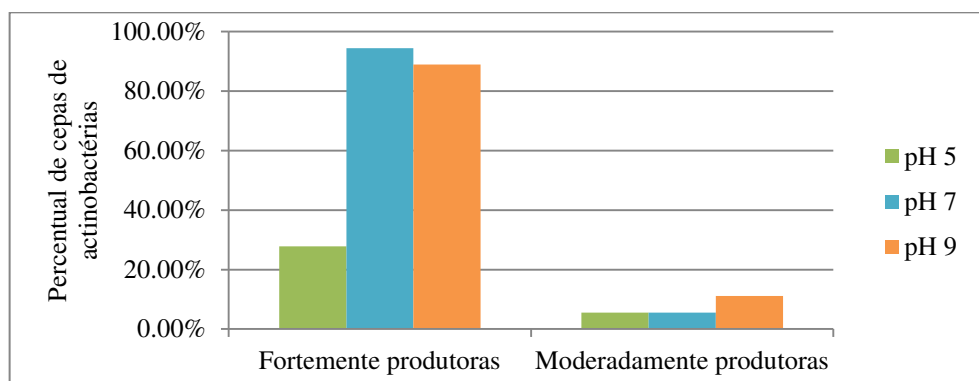
Gráfico 5 – Perfil da atividade amilolítica das cepas de actinobactérias em diferentes pHs.



Fonte: acervo do autor.

Conforme Silva *et al.* (2015), o perfil de hidrólise enzimática da amilase nos diferentes pHs permite classificar as cepas de actinobactérias quanto à intensidade na produção de amilase, dessa forma, nesse estudo foi possível classificar as cepas de actinobactérias com $1,5 \leq IE < 2$ como moderadamente produtoras e com $IE \geq 2,0$ como fortemente produtoras. No pH 5 apenas a cepa UB-08 apresentou-se como moderadamente produtora e as demais actinobactérias positivas para amilase (UB-04, UB-18, UB-20, UB-23 e UB-24) foram consideradas fortemente produtoras. Observou-se que nenhuma cepa teve IE menor que 1,5, dessa forma não foram identificadas cepas fracamente produtoras ($1,0 \leq IE < 1,5$). Pode-se destacar ainda que no pH 7, 17 cepas de actinobactérias (94,44%) apresentaram-se como fortemente produtoras (Gráfico 6). Esses resultados reforçam a influência do pH na atividade amilolítica, uma vez que, em pHs mais ácidos (pH 4) as cepas foram incapazes de degradar o amido, ou sofreram limitações (pH 5) na degradação desse substrato, o contrário do que aconteceu nos pHs neutro (7) e extremamente alcalino (9).

Gráfico 6 – Classificação das cepas de actinobactérias quanto à intensidade na produção de amilase em diferentes pHs.



Fonte: acervo do autor.

Conforme Ramos *et al.* (2015) e Brito *et al.* (2015) em experimentos sobre as características culturais e micromorfológicas, *Streptomyces* representa 55,56% dos gêneros das cepas de actinobactérias deste estudo. Dessa forma, além do seu conhecido potencial enzimático, os resultados do presente trabalho demonstram que esse gênero tolera uma ampla faixa de pH sem perder a capacidade de crescer, principalmente com uma suplementação do meio (KONTRO *et al.*, 2005), isso explica o fato de que mesmo com valores tão extremos de pH ainda foi possível observar crescimento e atividade enzimática, pois o meio contém peptona, além do amido.

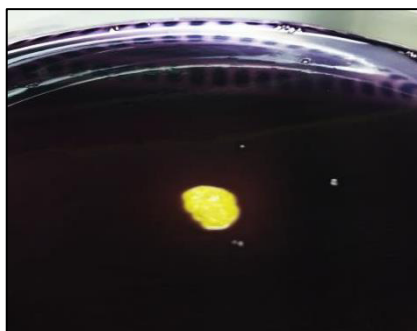
Pode-se observar que, apesar das actinobactérias serem capazes de colonizar ambientes extremos, como por exemplo, caracterizados por pHs ácidos ou alcalinos (ZENOVA; MANUCHAROVA; ZVYAGINTSEV, 2011), a atividade amilolítica não foi constatada no pH mais ácido testado, no entanto apresentaram crescimento acentuado nos demais pHs.

Sanomiya e Nahas (2003), estudando a influência do pH nas atividades enzimáticas dos microrganismos, constataram que o pH do solo afetava a frequência de bactérias amilolíticas, enquanto Maccheroni Jr.; Araújo; Azevedo (2004), verificaram que em meio solidificado, a produção de amilase por isolados de *Colletotrichum* obedecia a um padrão dependente do pH ambiental.

5.2.2 Concentrações salinas

Em relação à atividade amilolítica em diferentes concentrações de NaCl, as 18 cepas de actinobactérias cresceram em todas as concentrações testadas. Um fato interessante a se destacar é que as cepas UB-02 e UB-03 cresceram, mas não apresentaram halo de hidrólise nas concentrações NaCl 2%, 3% e 4%, por esse motivo não foi possível calcular o IE (Figura 4). O crescimento dessas cepas pode ser atribuído à presença de peptona como fonte de carbono e energia na composição do meio de cultura, ou mesmo que essas cepas hidrolisaram parcialmente o amido.

Figura 4 – Crescimento da cepa UB-02 na concentração de NaCl 2% demonstrando a ausência do halo de degradação do amido.



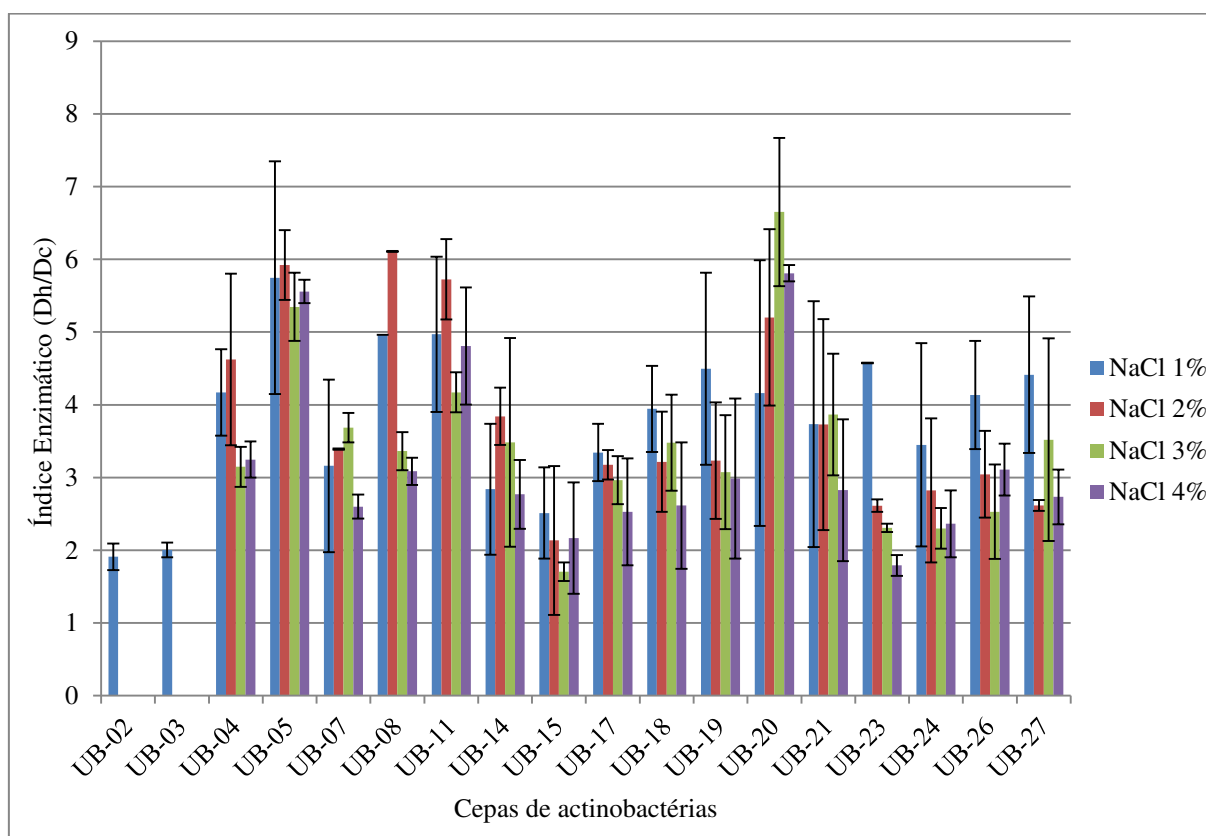
Fonte: acervo do autor.

Na concentração de 1% de NaCl, todas as cepas foram capazes de crescer e apresentar amilase positiva, evidenciado pelo halo de degradação. O índice enzimático variou de 1,9 para a cepa UB-02 a 5,7 para a cepa UB-05 (Gráfico 7). Além disso, é importante enfatizar que a

cepa UB-20, assim como no pH 5, apresentou o maior halo nessa concentração de NaCl e a cepa UB-02, apesar do menor tamanho de colônia, apresentou halo, demonstrando a sua capacidade de degradação dos compostos amilolíticos do meio nessa concentração. Esse resultado reforça a importância do índice enzimático, onde se considera não somente o diâmetro do halo de hidrólise, mas também o tamanho da colônia.

Um percentual de 88,89% das cepas de actinobactérias apresentaram atividade amilolítica na concentração de 2% de NaCl. Os IE das 16 cepas foram superiores a 2,5, tendo a cepa UB-08 o maior IE (6,1) e a UB-15 o menor IE (2,1) (Gráfico 7). Tanto na concentração de 3% de NaCl quanto na concentração de 4%, as maiores concentrações de NaCl testadas, todas as cepas apresentaram crescimento, porém apenas 16 cepas (88,89%) produziram halo de hidrólise. Em 3% de NaCl, apenas a cepa UB-15 apresentou um índice enzimático menor que 2, porém na concentração de 4% de NaCl essa cepa já demonstrou um IE superior. O contrário aconteceu para a cepa UB-23, que mostrou um IE de 2,3 na concentração de 2% NaCl e na concentração de 4% referido parâmetro foi 1,79 (Gráfico 7).

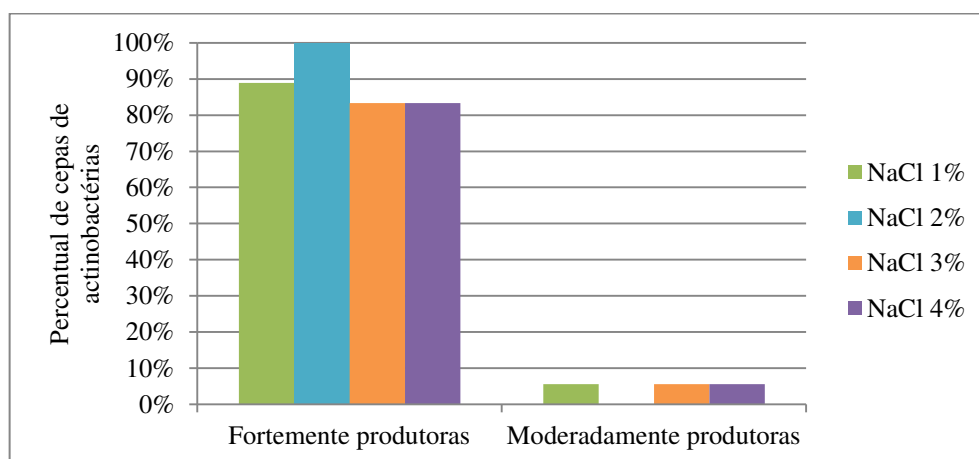
Gráfico 7 – Perfil da atividade amilolítica das cepas de actinobactérias em diferentes concentrações de NaCl.



Fonte: acervo do autor.

Conforme o critério utilizado para a classificação das actinobactérias no que se refere ao seu potencial enzimático para a degradação do amido, observou-se que na concentração de 1% de NaCl, 17 cepas apresentaram $IE \geq 2$, dessa forma foram consideradas como fortemente produtoras e somente a cepa UB-03 foi considerada moderadamente produtora ($1,5 \leq IE < 2$) por ter $IE=1,91$. Na concentração de 2% de NaCl todas as 16 cepas que apresentaram atividade amilolítica foram consideradas fortemente produtoras. Tanto na concentração de NaCl a 3% quanto a 4%, 83,33% das cepas de actinobactérias foram fortemente produtoras, sendo as cepas UB-15 e UB-23, as únicas classificadas como moderadamente produtoras nas concentrações de NaCl 3% e 4%, respectivamente (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Classificação das cepas de actinobactérias quanto à intensidade na produção de amilase em diferentes concentrações salinas.



Fonte: acervo do autor.

Na literatura não há referências a estudos sobre a atividade enzimática de actinobactérias em função da salinidade, porém Coronado *et al.* (2000) constataram a maior produção de amilase de uma cultura de *Halomonas meridiana* em meio de crescimento com amido numa concentração de 5% de NaCl. Embora a concentração de NaCl testada neste trabalho tenha sido até 4%, foi possível observar que todas as cepas de actinobactérias foram produtoras de amilase, pois, mesmo com as condições impostas, até 88,89% apresentaram atividade enzimática em todas as concentrações de NaCl testadas. Diante disso, pode-se inferir que essas cepas são tolerantes e aclimatam-se rapidamente aos níveis de salinidade acumulando osmólitos nas células (HAGEMANN, 2010) para assim neutralizarem o baixo potencial osmótico no meio e conseguirem crescer.

Oliveira *et al.* (2010) relacionaram o comportamento enzimático de rizóbios às condições fisiológicas dos solos da Amazônia, habitat do qual foram isolados. Assim, é possível que a atividade enzimática das cepas de actinobactérias registradas nas condições salinas mais extremas seja referente a um processo adaptativo dessas cepas aos solos salinos da região semiárida.

Os resultados obtidos neste estudo também são importantes do ponto de vista das interações ecológicas. Sousa *et al.* (2008) afirmaram que a salinidade do solo e os níveis de pH são fatores abióticos que podem interferir com a capacidade competitiva dos microrganismos. Assim, a tolerância para alta salinidade e baixo valores de pH são critérios para a seleção de microrganismos visando adaptação em solos salinos ou ácidos de forma que os mesmos sejam capazes de realizar suas funções biológicas no ecossistema. Como as cepas de actinobactérias utilizadas foram selecionadas por apresentarem $IE \geq 2,0$ (amilolítico) e interagirem positivamente com cepas de rizóbios (SILVA, 2016), é importante destacar que mesmo nas condições extremas a que foram submetidas *in vitro*, essas actinobactérias continuaram a ter atividade enzimática. Essa característica adaptativa pode contribuir para a permanência e sobrevivência de outros grupos microbianos por mecanismos de cooperação metabólica, como constatada por SILVA (2016), entre actinobactérias e rizóbios.

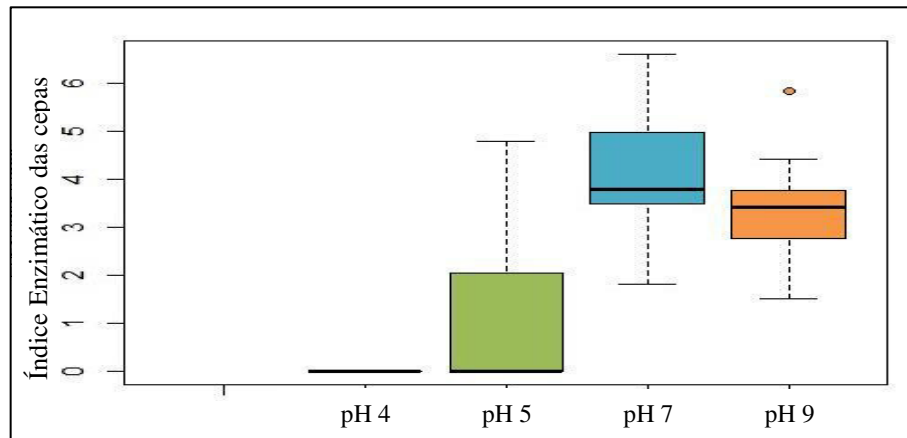
No referido trabalho, a interação metabólica para o amido foi testada em condições ambientais ótimas para os dois grupos de bactérias. Dessa forma, os resultados do presente estudo sugerem que interação continuaria ocorrendo mesmo em condições extremas, e, assim, as actinobactérias poderiam aumentar o *fitness* das bactérias fixadoras de nitrogênio (GOEL *et al.*, 2012) em solos de regiões semiáridas, garantindo a coexistência entre os dois grupos.

5.2.3 Análises estatísticas

A análise de regressão linear mostrou que os fatores abióticos pH e salinidade tiveram efeito significativo no índice enzimático das cepas de actinobactérias. Para o pH, $R^2=0,6916$, $p<0,05$.

Como esperado e já demonstrado nesse trabalho (5.1.1), os maiores índices enzimáticos foram registrados no pH 7 (Gráfico 9), próximo a faixa de pH ótimo para o crescimento dessas actinobactérias. Embora se tratando de outro grupo bacteriano, Oliveira *et al.* (2006) concluiu que, embora a atividade amilolítica de cepas de rizóbios tenha variado em função do pH do meio, os maiores índices foram registrados em pH 6,5.

Gráfico 9 – Distribuição de índices enzimáticos das cepas de actinobactérias em relação a diferentes pHs.

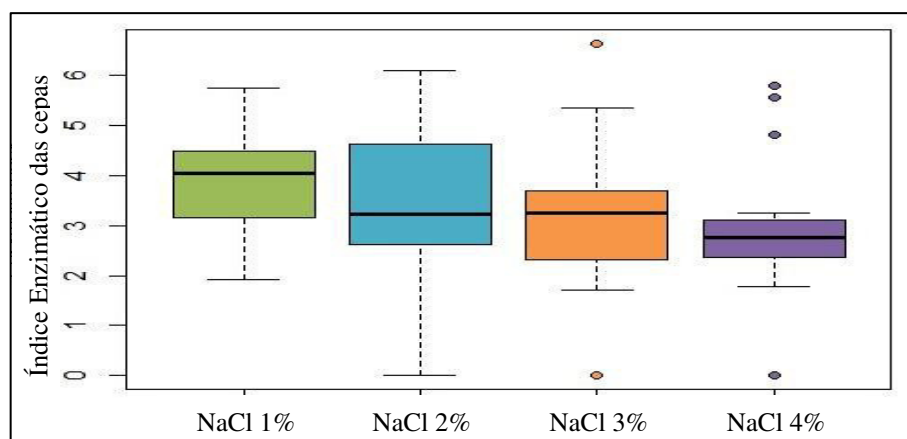


Fonte: acervo do autor.

O teste com NaCl entre as cepas de actinobactérias não apresentou diferença significativa ($p=0.2395$), com $R^2=0,05963$. Esse fato pode ser explicado devido aos *outliers*, que representam os índices enzimáticos das cepas UB-05, UB-11 e UB-20, estarem acima do limite superior do *boxplot* e as cepas UB-15 e UB-23, abaixo do limite inferior.

Embora os índices enzimáticos tenham variado de forma não significativa em relação à concentração salina, como supracitado, os maiores índices foram agrupados na concentração de 1 e 2% de NaCl (Gráfico 10). Devido a mais de 94% dessas actinobactérias apresentarem crescimento nas faixas de concentrações entre NaCl 1% e NaCl 2,5% (5.1.2), validamos a maior ocorrência dessa atividade enzimática das cepas nessas concentrações.

Gráfico 10 – Distribuição de índices enzimáticos das cepas de actinobactérias em relação a diferentes concentrações salinas.



Fonte: acervo do autor.

Como especificado por Sudharhsan *et al.* (2007), os resultados deste trabalho confirmaram a importância dos fatores abióticos na síntese e secreção de amilases microbianas. Assim, a atividade amilolítica configura um indicativo da presença de enzimas hidrolíticas no solo do PNU.

Importante ressaltar que o comportamento enzimático das cepas de actinobactérias é função do ambiente de onde foram isoladas. A esse respeito, Gorlach-Lira e Coutinho (2007) discutem que a reduzida disponibilidade de nutrientes e condições abióticas extremas, prevalentes no semiárido, influencia a atividade bioquímica do solo rizosférico, particularmente a produção de enzimas hidrolíticas, afetando o crescimento, sobrevivência e estruturação das populações microbianas desse ambiente.

6 CONCLUSÃO

As actinobactérias do Parque Nacional de Ubajara, no semiárido Nordeste, apresentaram crescimento e atividade amilolítica nas condições de pH e salinidade extremas, o que implica na disponibilização de nutrientes e energia necessários para manutenção de processos químicos e biológicos desse ecossistema.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir desse trabalho pretende-se testar a atividade celulolítica de cepas de actinobactérias metabolicamente compatíveis com rizóbios nessas mesmas condições de pH e salinidade e por fim avaliar se as interações actinobactéria-rizóbio, previamente conhecidas como positivas (SILVA, 2016), seriam alteradas ou anuladas com a aplicação dos diferentes efeitos abióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIYER, P. V. Amylases and their applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 13, p. 1525-1529, 2005.
- AKOND, M. A. *et al.* Effect of temperature, pH and NaCl on the isolates of actinomycetes from Straw and Compost Samples from Savar, Dhaka, Bangladesh. **American Journal of Microbiology and Immunology**, v. 1, n. 2, p. 10-15, 2016.
- ALARIYA, S. S. *et al.* Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. **Archives of Applied Science Research**, v. 5, n. 1, p. 15-24, 2013.
- ALLISON, S. D. *et al.* Soil enzymes: linking proteomics and ecological processes. In: Manual of Environmental Microbiology, Third Edition. **American Society of Microbiology**, 2007. p. 704-711.
- ALVES, A. R.; SOUTO, J. S.; SOUTO, P. C.; HOLANDA, A. C. Aporte e decomposição de serrapilheira em área de Caatinga, na Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n.2. p. 194-203, 2006.
- ARAÚJO, S. M. S. A Região Semiárida do Nordeste do Brasil; Questões Ambientais e possibilidades de Uso Sustentável dos Recursos. Rios Eletrônica – **Revista Científica da FASETE**, v. 5, 2011.
- ARIFUZZAMAN, M. *et al.* Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 4615-4619, 2010.
- ASHOKVARDHAN, T. *et al.* Actinomycetes from *Capsicum annuum* L. rhizosphere soil have the biocontrol potential against pathogenic fungi. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 894-903, 2014.
- BAIS, H. P. *et al.* The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**., v. 57, p. 233-266, 2006.
- BARKA, E. A. *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.
- BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in plant science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.
- BERNARDES, C. M. *et al.* População microbiana como indicadora de interferência de diferentes manejos de solos de cerrado com cultivo de soja. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 2, 2006.
- BERTIN, C.; YANG, X.; WESTON, L. A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and soil**, v. 256, n. 1, p. 67-83, 2003.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 151p.

- BOUIZGARNE, B.; AOUAMAR, A. A. B. Diversity of plant associated actinobacteria. In: Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture. **Springer International Publishing**, p. 41-99, 2014.
- BRITO, F. A. E.; RAMOS, K. A.; DA SILVA, R. M. ; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Actinobacteria from rizospheric soil in the caatinga biome. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 1992-2004, 2015.
- CHATER, K. F. *et al.* The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 171-198, 2010.
- CORONADO, M. J. *et al.* Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, n. 1, p. 67-71, 2000.
- CUNHA, B. B.; ARAÚJO, R. C. P. Avaliação das pressões e ameaças ambientais sobre o Parque Nacional de Ubajara-Ceará: Uma perspectiva da Efetividade de Gestão. **REDE - Revista Eletrônica do Prodeema**, v. 8, n. 1, 2014.
- DANTAS, J. S. *et al.* Interações entre grupos de microrganismos com a rizosfera. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 2, n. 2, p. 213-224, 2011.
- DURAIKANDIYAN, V. *et al.* Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. **Journal of Medical Mycology**, v. 20, n. 1, p. 15-20, 2010.
- EGAMBERDIEVA, D. *et al.* High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2008.
- EL-TARABILY, K. A. *et al.* Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 13-26, 2009.
- FIORITTO, A. *et al.* Decomposition of *Cistus incanus* leaf litter in a Mediterranean maquis ecosystem: mass loss, microbial enzyme activities and nutrient changes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 311-321, 2001.
- FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma strains*. **Enzyme research**, v. 2012, 2012.
- FREITAS, A. D. S. *et al.* Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.
- FREITAS, F. C. M. **Microbial activity due to soil salinity**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação do Semiárido) – Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2016.
- FUNGARO, M. H. P. *et al.* Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas à Indústria de Alimentos. **Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 426-453, 2002.

- GAO, B.; GUPTA, R. S. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 66-112, 2012.
- GEBREYOHANNES, G. Isolation and optimization of amylase producing bacteria and actinomycetes from soil samples of Maraki and Tewedros campus, University of Gondar, North West Ethiopia. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 31, p. 1877-1882, 2015.
- GOEL, A. *et al.* Metabolic shifts: a fitness perspective for microbial cell factories. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 12, p. 2147-2160, 2012.
- GONZÁLEZ, I. *et al.* Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.401-415, 2005.
- GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 135-141, 2007.
- GRIFFITHS, R. I. *et al.* The bacterial biogeography of British soils. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 1642-1654, 2011.
- GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003.
- HAGEMANN, M. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. 87-123, 2010.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- HART, S. P.; MARSHALL, D. J. Environmental stress, facilitation, competition, and coexistence. **Ecology**, 94: 2719-2731, 2013.
- HIRSCH, A. M. *et al.* Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. **Ecology**, v. 84, n. 4, p. 858-868, 2003.
- 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. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/prevfogo/planos_operativos/12-parque_nacional_de_ubajara-ce.pdf>. Acesso em 08 jun 2017.
- INSAM, H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. **Geoderma**, v. 100, n. 3, p. 389-402, 2001.
- JEFFREY, L. S. H. *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.

JESUS, J. A. **Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, 2013.

JOSHI, S. R.; SHARMA, G. D.; MISHRA, R. R. Microbial enzyme activities related to litter decomposition near a highway in a sub-tropical forest of north east India. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 12, p. 1763-1770, 1993.

KAFILZADEH, F. *et al.* Isolation of amylase producing aquatic Actinomycetes from the sediments of mangrove forests in south of Iran. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 33, p. 6281-6285, 2012.

KATHIRESAN, K.; MANIVANNAN, S. Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, 2006.

KAVAMURA, V. N. *et al.* Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.

KISHORE, P. **Isolation, characterization and identification of Actinobacteria of Mangrove ecosystem, Bhitarkanika, Odisha**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências da Vida, Instituto de Nacional de Tecnologia, Rourkela, 2011.

KONTRO, M. *et al.* pH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 32-38, 2005.

KURAMAE, Eiko E. *et al.* Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 1, p. 12-24, 2012.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, v. 202, n. 4935, p. 928-929, 1964.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

LIMA, B. G.; COELHO; M. F. B.; OLIVEIRA, O. F. Caracterização florística de duas áreas de caatinga na região centro-sul do Ceará, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 28, n.2, p. 277-296, 2012.

LIMA, J. V. L. *et al.* Characterization of actinobacteria from the semiarid region, and their antagonistic effect on strains of rhizobia. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 499, 2017.

LIMA, J. V. L. *et al.*, 2014. Microbial populations cultivable litter soil and of a storage unit in Brazilian semi-arid. **Enciclopédia Biosfera**, 10: 2300-2316.

LIMA, S. M. A. **Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela Actinobactéria ACTMS – 9H isolada da rizosfera de *Paullini cupana* Kunth**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

- LIN, J. E. *et al.* Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechnology Techniques**, v. 5, n. 4, p. 275-280, 1991.
- MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 298-302, 2004.
- MANGAMURI, U. K. *et al.* Isolation, identification and molecular characterization of rare actinomycetes from mangrove ecosystem of Nizampatnam. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 83-91, 2012.
- MANIVASAGAN, P. *et al.* Isolation, identification and characterization of multiple enzyme producing actinobacteria from sediment samples of Kodiyakarai coast, the Bay of Bengal. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 14, p. 1550-1559, 2010.
- MANSOUR, S. R.; ABDEL-AZEEM, A. M.; ABO-DERAZ, S. S. S. A new record of actinobacteria isolated from soil in Jerusalem and their enzymatic potential. **F1000Research**, v. 4, p. 1-10, 2015.
- MARTINS, S. C. M. *et al.* Effect of the rest on the recovery of a soil under caatinga of the Brazilian semiarid. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 2194-2204, 2014.
- MARTINS, C. M. *et al.* Rhizobial diversity from stem and root nodules of *Discolobium* and *Aeschynomene*. **Acta Scientiarum**, v. 37, p. 163, 2015.
- MENDES, R. *et al.* Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, v. 332, n. 6033, p. 1097-1100, 2011.
- MINNOTO, E. *et al.* Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, p. 16-23, 2014.
- MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, v. 13, p. 222-242, 2004.
- NUNEZ-SANTIAGO, M. C.; BELLO-PEREZ, L. A.; TECANTE, A. Swelling-solubility characteristics, granule size distribution and rheological behavior of banana (*Musa paradisiaca*) starch. **Carbohydrate polymers**, v. 56, n. 1, p. 65-75, 2004.
- OLIVEIRA, A. N. *et al.* Enzymatic activity of native Central Amazonian rhizobia strains grown in different levels of acidity. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 26, n. 1, p. 204-210, 2006.
- OLIVEIRA, A. N.; FLOR, N. S.; OLIVEIRA, L. A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, p. 401-404, 2010.
- OSHONE, R.; MANSOUR, S. R.; TISA, L. S. Effect of salt stress on the physiology of *Frankia* sp strain Cc16. **Journal of Biosciences**, v. 38, n. 4, p. 699-702, 2013.

- OSKAY, A. M.; USAME, T.; CEM, A. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 9, p. 441-446, 2004.
- OYELEKE, S. B.; AUTA, S. H.; EGWIM, E. C. Production and characterization of amylase produced by *Bacillus megaterium* isolated from a local yam peel dumpsite in Minna, Niger State. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 2, n. 7, p. 88-92, 2010.
- PACHECO, A. P. *et al.* Desertificação: contextualização e sensoriamento remoto. **Estudos Geológicos**, v. 24, p. 2, 2014.
- PADILHA, G. 1998. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Embrapa CNPMA**. 327-343.
- PALANIYANDI, S. A. *et al.* *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 766-773, 2014.
- PANDE, S. *et al.* Fitness and stability of obligate cross-feeding interactions that emerge upon gene loss in bactéria. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, 8: 953-962, 2014.
- PINHEIRO, M. S. *et al.* Isolation and screening of rhizobial strains native from semiarid tolerant to environmental stress. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 2071-2014, 2014.
- RAMESH, S.; MATHIVANAN, N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2103-2111, 2009.
- RAMOS, K. A.; BRITO, F. A. E.; NUNES, K. J. F.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Characterization and crhomogenic diversity of actinobacteria from undisturbed microbial niche in the caatinga biome. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 2115-2125, 2015.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011) **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>.
- SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Hydrolases producers microorganisms involved in the soil carbon and nitrogen cycling. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 835-842, 2003.
- SEMÊDO, L. T. A. S. *et al.* Isolation and caracterização of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Microbiological Research**, v. 155, p. 291-299, 2001.
- SHARMA, M. Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. **International Journal Current Microbiology Applied Science**, v. 3, p. 801-832, 2014.
- SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, T. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-29, 2015.
- SILVA, R. M. A. **Entre o combate à seca e a convivência com o semi-árido: transições paradigmáticas e sustentabilidade do desenvolvimento**. 2006. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável) – Universidade de Brasília, Centro de Desenvolvimento Sustentável, Brasília – DF, 2006.

SILVA, M. E. *et al.* Brazilian Cerrado Soil Actinobacteria Ecology. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2012.

SILVA, V. M. A. **Facilitação pode incrementar a capacidade de adaptação de actinobactérias e rizóbios "in vitro"**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SILVA, V. M. A.; BRITO, F. A. E.; RAMOS, K. A.; DA SILVA, R. M.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Enzymatic activity of actinobacteria from semiarid. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 560-572, 2015.

SILVA, V. M. A. *et al.* Effect of irrigation and type of cultivation on richness and diversity of chromogenic actinobacteria of soil from Ceará semiarid region. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 2965-2979, 2015a.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. **Campinas: Instituto Agrônômico**, 2007.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 1, p. 50-55, 2008.

SOUZA, L. H. *et al.* Efeito do pH do solo rizosférico e não rizosférico de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* na absorção de boro, cobre, ferro, manganês e zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 5, p. 1641-1652, 2010.

SUDHARHSAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; RANJITH, K. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 430-435, 2007.

SUMRIN, A. *et al.* Purification and medium optimization of α -amylase from *Bacillus subtilis* 168. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 2119-2129, 2011.

SUNEETHA, V.; RAJ, K; PRATHUSA, K. Isolation and identification of *Streptomyces* ST1 and ST2 strains from tsunami affected soils: morphological and biochemical studies. **Journal of Oceanography and Marine Science**, v. 2, p. 96-101, 2011.

TONKOVA, A.; MANOLOV, R.; DOBREVA, E. Thermostable α -amylase from derepressed *Bacillus licheniformis* produced in high yields from glucose. **Process Biochemistry**, v. 28, n. 8, p. 539-542, 1993.

UREN, N. C. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. **The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. Marcel Dekker, New York, p. 1-21, 2007.

VAN DER MAAREL, Marc JEC *et al.* Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

VENTURA, M. *et al.* Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p.495-548, 2007.

VINHAL-FREITAS, I. C. *et al.* Microbial and enzymatic activity in soil after organic composting. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 757-764, 2010.

WILLIAMS, S. T.; VICKERS, J. C. Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. **Biology of Actinomycetes**, v. 88, p. 265-270, 1988.

WINK, J. M., 2012. Compendium of actinobacteria. **University of Braunschweig**. 1-37.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudomonas* fluorescentes associadas à cultura de couve: influência da adubação. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 3, 2011.

ZANELLA, M. E. Considerations on climate and water resources of the Northeastern semiarid. **Caderno Prudentino de Geografia**, n. 36, p. 126-142, 2014.

ZENOVA, G. M.; MANUCHAROVA, N. A.; ZVYAGINTSEV, D. G. Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. **Eurasian Soil Science**, v. 44, p. 417-436, 2011.