



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE AGRONOMIA**

**JÉSSYCA DA SILVA MARQUES**

**CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, MORFOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE  
ACTINOBACTÉRIAS DE ÁREAS CULTIVADAS DE UBAJARA**

**FORTALEZA**

**2022**

JÉSSYCA DA SILVA MARQUES

CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, MORFOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE  
ACTINOBACTÉRIAS DE ÁREAS CULTIVADAS DE UBAJARA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Miranda Martins.

FORTALEZA

2022

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

---

M318c Marques, Jéssyca da Silva.  
Caracterização cultural, morfológica e enzimática de actinobactérias de áreas cultivadas de Ubajara /  
Jéssyca da Silva Marques. – 2022.  
68 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências  
Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Claudia Miranda Martins.

Coorientação: Prof. Me. Leonardo Lima Bandeira.

1. Caatinga. 2. Enzimas extracelulares. 3. Microbiota. 4. Saccharopolyspora. I. Título.

CDD 630

---

JÉSSYCA DA SILVA MARQUES

CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, MORFOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE  
ACTINOBACTÉRIAS DE ÁREAS CULTIVADAS DE UBAJARA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia.

Aprovada em: 12/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Claudia Miranda Martins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Suzana Cláudia Silveira Martins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Me. Fernando Gouveia Cavalcante  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Me. Leonardo Lima Bandeira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Ao meu amado Berg.

Aos meus pais, Rosa e João.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar esperança para seguir adiante nos obstáculos que surgiram ao longo do caminho.

Ao meu esposo, Berg Barbosa, que foi meu maior incentivador, acreditando em mim quando nem mesmo eu acreditei.

Aos meus pais, Rosa Cabral e João Marques, pelo sonho compartilhado, amor, apoio, investimentos e por tudo que sempre fizeram por mim.

A Profa. Dra. Claudia Miranda Martins, pela paciência e compreensão e pela excelente orientação.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental por terem me acolhido em seu laboratório, pela paciência, palavras de incentivo e ensinamentos, aos doutorandos Alana Ximenes e Leonardo Bandeira por toda a ajuda e orientação.

Aos meus irmãos, Rodrigo, Mayara, Ivina, Iviane e Jonhny, e sobrinhos, Tiago, Ágatha, por todo o suporte e incentivo que recebi ao longo desses anos.

Aos amigos de graduação, Vitor, Fabiana, Thiago, Rosângela, Caetano, Caio e Aristides, que fizeram parte da rotina cansativa e tornaram meus dias melhores nesses últimos anos.

Aos queridos Cláudia Montalverne, Lucas Fortaleza e Felipe Lima por todo o amparo e conversas nessa caminhada longa que foram os últimos dois anos.

“No grito do aboio  
No ronco do trator  
No canto da colheita  
Em tudo o seu amor.”

**Luiz Gonzaga**

## RESUMO

As actinobactérias são microrganismos amplamente distribuídos na natureza, habitando principalmente o solo na região rizosférica. Essas bactérias Gram-positivas que formam um grupo diverso quanto a morfologia, cultura e estruturas micromorfológicas, são responsáveis pela produção de vários metabólitos como antibióticos, antifúngicos, agentes quimioterápicos e enzimas. Sendo esses microrganismos também encontrados no semiárido nordestino e de grande interesse industrial e agrônômico, o presente estudo teve como objetivo isolar cepas de actinobactérias provenientes de um município do semiárido cearense e caracterizá-las culturalmente, avaliar a produção das enzimas amilase, celulase e xilanase e classificá-las baseando-se na micromorfologia. As amostras de solo foram coletadas em seis áreas de agricultura de Ubajara (CE) e foram realizadas análises físicas e químicas. Foram isoladas 28 cepas de actinobactérias. Foi observado o predomínio da cor branca, tanto no micélio aéreo (46%) como no reverso (36%), seguida das cores cinza e amarelo no micélio aéreo e amarela e cinza, no reverso. 71,4% das cepas apresentaram o micélio reverso semelhante do micélio aéreo. Todas as cepas apresentaram produção de amilase, sendo 88,29% delas classificadas como fortemente produtoras da enzima. A atividade celulolítica foi observada em 60,71% das cepas analisadas, sendo 14 cepas classificadas como fortemente produtoras. A cepa TUB 18 se destacou com elevados valores de índices enzimáticos amilolítico (6,03) e celulolítico (12,32). Em 82,14 % das cepas observou-se o halo indicador da degradação da xilana, das quais 78,57% foram classificadas como cepas fortemente produtoras de xilanase, as cepas TUB 7 e TUB 8 destacaram-se com os maiores índices enzimáticos, 8,89 e 8,56, respectivamente. O gênero predominante entre as cepas isoladas foi o *Streptomyces* (75%), foram identificados mais quatro gêneros sendo eles *Actinomadura*, *Thermosmonospora*, *Streptosporangium* e *Saccharopolyspora*.

**Palavras-chave:** Caatinga; enzimas extracelulares; microbiota; *Saccharopolyspora*

## ABSTRACT

Actinobacteria are microorganisms widely distributed in nature, inhabiting mainly the soil in the rhizospheric region. These Gram-positive bacteria, which form a diverse group in terms of morphology, culture and micromorphological structures, are responsible for the production of various metabolites such as antibiotics, antifungals, chemotherapeutic agents and enzymes. Since these microorganisms are also found in the northeastern semi-arid region and are of great industrial and agronomic interest, the present study aimed to isolate strains of actinobacteria from a municipality in the semi-arid region of Ceará and culturally characterize them, evaluate the production of amylase, cellulase and xylanase enzymes and classify them based on micromorphology. Soil samples were collected in six agricultural areas in Ubajara (CE) and physical and chemical analyzes were performed. Twenty-eight strains of actinobacteria were isolated. The predominance of white color was observed, both in the aerial mycelium (46%) and in the reverse (36%), followed by gray and yellow colors in the aerial mycelium and yellow and gray in the reverse. 71.4% of the strains showed the reverse mycelium similar to the aerial mycelium. All strains showed amylase production, with 88.29% of them classified as strongly producing the enzyme. Cellulolytic activity was observed in 60.71% of the analyzed strains, with 14 strains classified as strong producers. The TUB 18 strain stood out with high values of amylolytic (6.03) and cellulolytic (12.32) enzymatic indices. In 82.14% of the strains, the halo indicating the degradation of xylan was observed, of which 78.57% were classified as strongly xylanase-producing strains, the TUB 7 and TUB 8 strains stood out with the highest enzymatic indices, 8.89 and 8.56, respectively. The predominant genus among the isolated strains was *Streptomyces* (75%), four more genera were identified, namely *Actinomadura*, *Thermomonospora*, *Streptosporangium* and *Saccharopolyspora*.

**Keywords:** Caatinga; extracellular enzymes; microbiota; *Saccharopolyspora*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Delimitação do semiárido brasileiro .....	22
Figura 2 - Localização do município de Ubajara. ....	25
Figura 3 - Etapas para a realização do microcultivo .....	32
Figura 4 - Coloração de Gram da cepa TUB 17 visualizada no aumento 100x. ....	38
Figura 5 - Visualização geral da diversidade de cores do micélio aéreo das cepas de actinobactérias oriundas do Parque Nacional de Ubajara, Ceará. ....	39
Figura 6 - Registro fotográfico das colônias isoladas de 28 cepas de actinobactérias e de duas amostras de fungos TUB 1 e TUB 10.....	41
Figura 7 - Halo de hidrólise de amido na cepa TUB 13 isolada da área de agricultura A92 localizada em Ubajara, Ceará. ....	44
Figura 8 - Halo de hidrólise de amido na cepa TUB 26 isolada da área de agricultura A74 localizada em Ubajara, Ceará. ....	48
Figura 9 - Halo de hidrólise de xilana na cepa TUB 24 isolada da área de agricultura A61, Ubajara, Ceará. ....	51
Figura 10 - Registro fotográfico das estruturas micromorfológicas de 2 fungos e 28 actinobactérias oriundas de áreas de agricultura de Ubajara, CE.....	56

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos isolados conforme cor do reverso. ....	40
Gráfico 2 - Distribuição dos isolados conforme cor do micélio aéreo. ....	40
Gráfico 3 - Índice amilolítico de actinobactérias de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará. .....	46
Gráfico 4 - Categorização das cepas de actinobactérias provenientes de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará, quanto ao índice amilolítico. ....	47
Gráfico 5 - Índice celulolítico de actinobactérias de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará. .....	49
Gráfico 6 - Categorização das cepas de actinobactérias provenientes de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará, quanto ao índice celulolítico. ....	50
Gráfico 7 - Índice xilanolítico de actinobactérias de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará. .....	52
Gráfico 8 - Categorização das cepas de actinobactérias provenientes de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará, quanto ao índice xilanolítico. ....	53
Gráfico 9 - Categorização das cepas de actinobactérias em produtoras de celulase e xilanase de acordo com o microclima. ....	53
Gráfico 10 - Distribuição dos isolados conforme o gênero. ....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontos de coleta das amostras de solo .....	27
Tabela 2 - Composição do meio CDA.....	30
Tabela 3 - Nomenclatura das colônias conforme a área .....	31
Tabela 4 - Composição do meio Amido .....	33
Tabela 5 - Composição do meio CMC .....	34
Tabela 6 - Composição do meio Xilana.....	34
Tabela 7- Caracterização química do solo coletado nas áreas de agricultura, Ubajara (CE). ..	37
Tabela 8 - Quantificação de micronutrientes no solo coletado nas áreas de agricultura, Ubajara (CE). .....	37
Tabela 9 - Caracterização física do solo coletado nas áreas de agricultura, Ubajara (CE).....	38
Tabela 10 - Índice enzimático (IE) de amilase de cepas de actinobactérias isoladas de áreas de agricultura do Parque Nacional de Ubajara, no Ceará. Os resultados correspondem à média de oito repetições.....	45
Tabela 11 - Índice enzimático (IE) de celulase de cepas de actinobactérias isoladas de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará. Os resultados correspondem à média de oito repetições. ....	48
Tabela 12 - Índice enzimático (IE) de xilanase de cepas de actinobactérias isoladas de áreas de agricultura do PNU, no Ceará. Os resultados correspondem à média de oito repetições. ....	51

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ASA	Articulação no Semiárido Brasileiro
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPECE	Instituto de Pesquisa e Estratégia do Ceará
LAMAB	Laboratório de Microbiologia Ambiental
SUDENE	Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste
UFC	Universidade Federal do Ceará

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Microbiota do solo .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Actinobactérias .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Enzimas: Amilase, celulase e xilanase.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Semiárido.....</b>	<b>22</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Geral .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Específicos .....</b>	<b>24</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Área de estudo.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2. Amostragem .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3. Análises físicas e químicas do solo.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4. Inoculação e isolamento das Actinobactérias.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Caracterização dos isolados.....</b>	<b>31</b>
4.5.1 Coloração de Gram.....	31
4.5.2 Cor da massa aérea e micélio reverso.....	31
4.5.3 Microcultivo .....	32
<b>4.6. Atividade enzimática .....</b>	<b>33</b>
4.6.1. Atividade amilolítica.....	33
4.6.2. Atividade celulolítica.....	33
4.6.3. Atividade xilanolítica.....	34
4.6.4. Determinação do perfil enzimático.....	35
4.6.5 Análise Estatística.....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Obtenção e seleção dos isolados.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 Análises de solo .....</b>	<b>36</b>
<b>5.3 Coloração de Gram .....</b>	<b>38</b>
<b>5.4 Caracterização enzimática.....</b>	<b>39</b>
5.4.1 Atividade amilolítica.....	44
5.4.2 Atividade celulolítica.....	47
5.4.3 Atividade xilanolítica.....	50

<b>5.5 Caracterização cultural.....</b>	<b>39</b>
<b>5.6 Microcultivo .....</b>	<b>54</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A maioria da diversidade microbiana se encontra nos habitats terrestres, em especial no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). De acordo com Andreote e Cardoso (2016), as comunidades microbianas presentes no solo são responsáveis pela manutenção dos serviços ecossistêmicos sendo essenciais para conservação das características do solo. Os microrganismos são importantes não só por participarem da maioria dos ciclos biogeoquímicos, como a ciclagem do nitrogênio e a transformação da matéria orgânica, mas também por fazer parte de processos biotecnológicos, sendo fontes de novas substâncias e outros metabólitos de interesse industrial, podendo ainda ser promotores da biorremediação e do biocontrole (CURTIS; SLOAN, 2005).

Kumar *et al.* (2018) ao analisar bactérias presentes no solo determinaram que as actinobactérias compreendem cerca de 30% da população total de bactérias nesse ambiente, e Jayasinghe e Parkinson (2008) registraram que em alguns solos a população de actinobactérias é mais numerosa que a de outras bactérias. Esse grupo de microrganismos tem importância: ambiental, pois atuam nos processos de ciclagem de nutrientes e na biorremediação de xenobióticos; econômica, pela síntese de vitaminas e enzimas de aplicação industrial e por serem empregadas na produção de biocombustíveis; e biotecnológica, produzindo metabólitos secundários biologicamente ativos, em especial os antibióticos (MIAO; DAVIES, 2010; VENTURA *et al.*, 2007). Uma peculiaridade das actinobactérias é produzir compostos terpenóides que dão ao solo um odor característico de solo recém arado (SHARMA, 2014).

As actinobactérias durante muito tempo foram classificadas no reino Fungi, por apresentar diversas características similares aos fungos na sua morfologia geral, como a formação das hifas vegetativas e liberação de esporos (SHARMA, 2014). Somente após a constatação da ausência do núcleo e de esteróis na parede celular, presença de flagelo e sensibilidade à antibióticos antibacterianos os pesquisadores puderam classifica-las como bactérias (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1970).

O filo Actinobacteria possui 79 famílias e 425 gêneros e representa um dos maiores filos dentro do domínio Bacteria, ele é formado por bactérias Gram-positivas com DNA constituído principalmente por guanina e citosina, que formam hifas e esporos assexuais (SALAM *et al.*, 2020).

As actinobactérias podem ser autotróficas, heterotróficas, quimiotróficas ou fototróficas, quanto à respiração podem ser aeróbias estritas, anaeróbias facultativas, microaerófilas ou anaeróbias estritas (KENNEDY, 1999). Morfologicamente, o filo

Actinobacteria é diverso. Os gêneros *Micrococcus* e *Arthrobacter* possuem forma de cocos e de coco-bacilo, respectivamente. Já o gênero *Nocardia* possui hifas curtas e rudimentares, enquanto que o gênero *Streptomyces* possui micélio ramificado e complexo (VENTURA *et al.*, 2007).

Alguns gêneros formam esporos, como as bactérias do gênero *Streptosporangium* que são formadoras de esporangiósporos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os esporos são resistentes à dessecação pois são hidrofóbicos (GOODFELLOW *et al.*, 1998), portanto esse é o principal mecanismo de reprodução desses microrganismos, sendo uma vantagem pois os esporos são dispersos de forma aérea e podem atingir longas distâncias e os mais diversos habitats, inclusive secos (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Há também a dispersão pelo movimento da água no solo, utilizada pelas actinobactérias hidrofílicas não formadoras de hifas aéreas (MCCARTHY, 1992).

Por possuírem uma grande diversidade morfológica, fisiológica e metabólica e a maioria ser de vida livre, as actinobactérias podem ser encontradas nos mais diversos habitats tanto terrestres quanto aquáticos, sendo abundantemente encontradas no solo (SILVA *et al.*, 2013). Já foram isoladas nos mais diferentes solos e ecossistemas pelo mundo, como em região de mangue na Índia (SATHYA; USHADEVI, 2014), regiões áridas do Iraque (SAMER, 2015), região desértica no Chile (BULL; ASENJO, 2013), e no Brasil foram isoladas em diversos biomas como Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Amazônia e Pantanal (SILVA *et al.*, 2013; SILVA, 2013; JESUS, 2013; OLIVEIRA, 2015; GOS, 2017).

Na natureza as actinobactérias ocupam as mais diversas funções, que incluem fixadores de nitrogênio, comensais de planta, saprófitos, simbioses do trato gastrointestinal, decompositores da matéria orgânica e antagonistas de patógenos, como exemplos cita-se os respectivos gêneros *Frankia*, *Leifsonia*, *Oerskovia*, *Bifidobacterium* e *Streptomyces* (GEORGE, *et al.*, 2012; KENNEDY, 1999; MEHRAVAR *et al.*, 2010; VENTURA *et al.*, 2007).

Metabólitos secundários são compostos não essenciais para os microrganismos que são sintetizados na fase final do crescimento exponencial. As actinobactérias possuem uma capacidade excepcional de sintetizar esses compostos, tanto de ação antibiótica (PRIYADHARSINI; DHANASEKARAN, 2015) quanto de ação hidrolítica (SILVA *et al.*, 2015), no último caso se destacam as bactérias que sintetizam as enzimas amilase, celulase e xilanase.

Embora os componentes lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina) sejam os mais abundantes na biomassa vegetal, estes representam compostos de difícil degradação

(IRFAN *et al.*, 2012). Dessa forma, microrganismos, como as actinobactérias, que produzem enzimas capazes de degradar esses compostos naturais complexos tornam-se relevantes na sustentabilidade do sistema ecológico (BALDRIAN, 2014).

As actinobactérias exercem um importante papel na ciclagem de nutrientes no solo contribuindo para a sustentabilidade dos ecossistemas, pois produzem enzimas extracelulares capazes de degradar moléculas complexas presentes no solo como celulose, amido, hemicelulose e húmus. Enzimas como amilase, celulase e xilanase atuam na hidrólise de macromoléculas, mineralizando os nutrientes tornando-os disponíveis no solo (BURNS *et al.*, 2013). Diversos estudos de actinobactérias provenientes da caatinga relatam a produção dessas enzimas (SILVA *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2018)

Diante da importância das actinobactérias, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização cultural, enzimática e micromorfológica de actinobactérias provenientes de áreas cultivadas de Ubajara (CE). Essa pesquisa poderá ser utilizada como suporte científico para futuros trabalhos a respeito desses microrganismos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Microbiota do solo

O solo é constituído de materiais minerais e orgânicos, e formado por partes sólidas, líquidas e gasosas, é um componente essencial da biosfera, visto que funciona como um sistema biológico complexo, dinâmico e tridimensional, que comporta uma vasta diversidade biológica, os organismos presentes no solo e as relações entre eles são a base para a manutenção do equilíbrio ecológico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; RAAIJMAKERS *et al.*, 2009; BERENDSEN *et al.*, 2012).

A estrutura do solo tem intensa relação com a comunidade microbiana e sua diversidade, já que os agregados são a base para a aderência microbiana, pois a disposição das suas partículas (areia, silte e argila) cria micro-habitats com diferentes propriedades físico-químicas e que serão colonizados por diversos microrganismos que exercem as mais diversas funções, gerando variações na comunidade microbiana presente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; LAMBAIS *et al.*, 2005).

Além do micro-habitat, fatores bióticos e abióticos influenciam a diversidade e abundância dos microrganismos do solo. A combinação de fatores como genética, interações inter e intra comunidades microbianas, pH, temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes estabelece como a microbiota vai se estruturar (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; ZHAO *et al.*, 2011; NANNIPIERI *et al.*, 2003).

Woese (1977) dividiu os seres vivos em três domínios, Archaea, Bacteria e Eukarya, a microbiota do solo é composta por organismos dos três domínios, mas destaca-se o domínio Bacteria, já que as células bacterianas tem uma densidade de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  por grama de solo. Apesar dessa elevada densidade, estima-se que apenas de 15 a 30% são células metabolicamente ativas (HORNER-DEVINE *et al.*, 2003; LAMBAIS *et al.*, 2005).

A microbiota do solo atua na alteração das características físicas do solo, na ciclagem de nutrientes, na decomposição da matéria orgânica e produção de húmus, no controle biológico de patógenos, na decomposição de xenobióticos e na produção dos mais diversos metabólitos, como fitohormônios, enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e compostos alelopáticos, o desempenho desses processos são de extrema importância para o funcionamento do ecossistema do solo (KENNEDY; PAPENDICK, 1995; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2008).

As actinobactérias representam aproximadamente 30% da microbiota do solo (KENNEDY, 1999), o que ressalta a importância do estudo desses microrganismos.

## 2.2 Actinobactérias

O filo Actinobacteria é composto por 6 classes, 46 ordens, 79 famílias e 425 gêneros e representa um dos maiores filos dentro do domínio Bacteria, ele é formado por bactérias Gram-positivas que possuem no seu DNA uma alta concentração das bases nitrogenada guanina e citosina e que formam hifas multinucleadas filamentosas e esporos assexuais, são microrganismos de distribuição cosmopolita, por ocupar os mais diversos ambientes, estão presentes na água, nas plantas e, principalmente, no solo, onde se apresentam em maior abundância na região de influência das raízes das plantas denominada de rizosfera (SALAM *et al.*, 2020; SHARMA; 2014; ZHAO *et al.*, 2011; LEWIN, 2016).

A rizosfera é definida como a camada do solo diretamente influenciada pelo metabolismo radicular que apresenta alta diversidade e densidade de microrganismos devido à liberação de exsudados. A exsudação da raiz forma uma região rica em energia para a microbiota e facilita a mineralização dos nutrientes presentes nos restos de matéria orgânica, disponibilizando-os para a absorção das raízes (BERG; EBERL; HARTMANN, 2005; MELO, 1998).

O filo inclui gêneros com diversas características morfológicas e reprodutivas. Os gêneros *Micrococcus*, *Arthobacter* e *Corynebacterium*, tem como forma de reprodução a fissão binária, já os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, formam micélio substratal rudimentar que se ramifica e fragmenta em estruturas cocóides ou semelhantes a bastonetes, dando origem a um novo micélio. O grupo denominado genericamente como esporoactinobactérias é formado por actinobactérias de grande complexidade morfológica, pois possuem a formação de esporos em regiões específicas do micélio. Gêneros como *Streptomyces*, *Actinoplanes* e *Microbispora* possuem um micélio aéreo bem desenvolvido com estruturas especializadas, como os esporos em cadeia presentes no gênero *Streptomyces*, os esporos vesiculares nos gêneros *Actinoplanes* e *Streptosporangium*, e os endósporos no gênero *Thermoactinomyces* (CHAPTER; HOPWOOD, 1993; CROSS, 1989; LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1981).

A organização celular das actinobactérias é procariótica típica, possuindo um núcleo fibrilar e uma região citoplasmática granular com ribossomos. O citoplasma é envolto por uma membrana única típica que pode conter variadas inclusões a depender da espécie e do meio de crescimento. A colônia pode ter uma morfologia variada, podendo ser um

emaranhado micelial complexo, semelhante ao observado em alguns eucariotos, ou até estruturas fragmentadas semelhantes a bastonetes ou cocos (CROSS, 1989).

As actinobactérias encontram-se presentes nos mais diversos ambientes seja aquático ou terrestre, sendo mais comum no terrestre, e ocorrem nas mais diversas condições, inclusive já foram relatadas em condições extremas como em solo do deserto do Atacama no Chile (OKORO *et al.*, 2009), solos áridos e salinos do Rajastão na Índia (BINAYKE, 2018) e solo glacial (REDDY *et al.*, 2010). Fatores abióticos como temperatura, pH e fonte de energia atuam como determinantes para a abundância, distribuição das espécies e diversidade do Filo Actinobacteria (ZHAO *et al.*, 2011).

No solo as actinobactérias desempenham uma série de funções ecológicas importantes, como as fixadoras de nitrogênio do gênero *Frankia*, as patogênicas do gênero *Mycobacterium* e as que atuam na degradação de compostos complexos como celulose, lignina e quitina, devido a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas e lipolíticas (VENTURA *et al.*, 2007; BULL; ASENJO, 2013).

Existem um grande interesse no isolamento e na caracterização das actinobactérias porque esses microrganismos são grandes produtores de metabólitos secundários e de bioativos, como antibióticos, anti-inflamatórios, antitumorais, imunomoduladores e enzimas extracelulares de aplicação industrial, além de atuarem na biodegradação de compostos recalcitrantes, incluindo compostos poluentes. O que fundamenta a ampla exploração desses microrganismos tanto na área biotecnológica como na área agrícola (ELBENDARY *et al.*, 2018; LEIVA *et al.*, 2004).

Destaca-se a potencial utilização de actinobactérias em processos de biorremediação, já que que esses microrganismos tem a habilidade de decompor substâncias complexas, Escudero, Daza e Torres (2012), estudando 20 cepas de solo proveniente da Colômbia, relataram bioensaios positivos para a degradação de lignocelulose.

O gênero *Streptomyces* é o de maior relevância, é formado por cerca de 972 espécies (PARTE *et al.*, 2020) e possuem um ciclo de vida complexo, podem ocorrer em ambientes aquáticos, mas são mais encontradas no solo. Possuem uma diversidade de tamanho e estrutura genômica, o que influencia na variedade morfológica, bioquímica e produção metabólica desse gênero (MADIGAN *et al.*, 2004; ANTUNES *et al.*, 2013)

Apesar da produção de antibióticos, constatada em diversas espécies do Filo Actinobacteria, ser uma característica notável e promissora muito explorada pela indústria biotecnológica (AZUMA, 2011), estudos apontam que o potencial enzimático dessas bactérias filamentosas também tem sua relevância, as enzimas tem grande aplicação em diversas áreas

como na ambiental, pela capacidade de degradar lignocelulose, e nas indústrias alimentícia, têxtil, de papel, de detergente entre outras (LAZZARINI *et al.*, 2000). Entre as enzimas extracelulares produzidas por esse grupo de bactéria podem ser citadas amilase, celulase e xilanase.

### 2.3 Enzimas: Amilase, celulase e xilanase

As amilases são as enzimas mais utilizadas na indústria alimentar pela sua capacidade de hidrolisar o amido, a  $\alpha$ -amilase é utilizada na panificação e na malteação, e a  $\beta$ -amilase é utilizada na produção de xaropes. Além das indústrias de alimento, elas também são usadas em várias outras indústrias como as de papel, celulose e têxtil. Com o aumento em seu espectro de aplicação a demanda por elas está aumentando continuamente (FERNANDES *et al.*, 2007).

As amilases são enzimas capazes de degradar o amido, que é um polissacarídeo formado por unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\beta$ -1,6, é a principal reserva energética das plantas superiores e o principal carboidrato empregado na alimentação humana (CEREDA *et al.*, 2001).

O amido é composto por dois tipos de macromoléculas, a amilose e a amilopectina. A amilose é uma macromolécula linear formada com 500 a 2000 unidades de glicoses unidas em grande maioria com ligações  $\alpha$ -1,4, possuindo pouca ramificação (menos de 0,1%). Já a amilopectina é a macromolécula com a maior proporção na composição do amido (75 a 80%), possui um alto grau de ramificação que é causada pelas ligações  $\beta$ -1,6 (5 a 6%). Essa molécula possui um grau de polimerização da ordem de  $10^4$  a  $10^5$ , bem superior à amilose. Em termos de massa molecular média a amilose tem a menor massa, sendo  $1,5 \times 10^5$  a  $10^6$  enquanto que a da amilopectina é de  $0,5 \times 10^8$  a  $10^9$  (POLESI, 2011).

A enzima  $\alpha$ -amilase é classificada como uma endoenzima pelo seu mecanismo de ação, elas podem hidrolisar ligações glicosídicas em qualquer lugar ao longo da molécula de amido, gerando produtos como glicose, maltose e dextrina. Já a  $\beta$ -amilase é uma exoenzima que só consegue atuar nas extremidades das cadeias e não consegue hidrolisar o amido além dos pontos de ligações  $\beta$ -1,6 presentes na amilopectina (SCIPIONE, 2011).

As enzimas capazes de degradar a celulose são denominadas celulases. A celulose é o principal polissacarídeo estrutural das plantas pois pode representar até 30% em paredes celulares primárias e de 50 a 80% em secundárias (CASTRO; PEREIRA, 2010). É formada por unidades de glicose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4 (TAO *et al.*, 2010), o dissacarídeo

formado pela ligação de duas glicoses recebe a denominação de celobiose e se repete como um padrão ao longo da molécula (JIANG *et al.*, 2011).

O grupo das celulases é subdividido em três tipos enzimas, as endoglucanases, as exoglucanases e as beta-glicosidases. As endoglucanases atacam as fibras de celulose em qualquer local e formam cadeias menores com um menor número de unidades de glicose, já as exoglucanases e as beta-glicosidases só conseguem agir nas extremidades da molécula, resultando em celobiose ou unidades de glicoses livres no primeiro caso e unidades de glicoses livres no segundo (CASTRO; PEREIRA, 2010).

A hemicelulose é um polímero ramificado de baixa massa molecular composto por unidades de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e/ou ácidos urônicos. Compõe a parede celular vegetal, representando entre 15 a 35% da biomassa. (FENGEL; WEGENER, 1989).

A xilana é o principal componente da hemicelulose, é um polissacarídeo formado por unidades de xilose na cadeia principal, unidas entre si com ligação do tipo  $\beta$ -1,4, a origem da molécula influencia nas diferentes substituições que podem acontecer na cadeia principal fazendo com que a xilana tenha uma estrutura complexa e variável (COUGHLAN, 1992).

Pelas xilanas possuírem uma estrutura complexa e heterogênea, para sua hidrólise completa em unidades de xilose, é necessária a combinação de diversas enzimas como as endoxilanases e exoenzimas como as  $\beta$ -xilosidase, que atuam na degradação da cadeia principal. As endoxilanases agem nas ligações glicosídicas internas enquanto as  $\beta$ -xilosidases atuam na extremidade da cadeia (COUGHLAN, 1992). As cadeias laterais são degradadas por enzimas como as  $\alpha$ -glicuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases e acetil xilana esterases (FERREIRA-FILHO, 1994).

As enzimas hidrolíticas como as amilases são amplamente utilizadas na indústria alimentícia de processamento de amido (GUPTA *et al.*, 2003), as celulases na indústria de detergentes, têxtil e na produção de etanol (LIN; TANAKA, 2006) e as xilanases na indústria alimentícia e de papel (PILON *et al.*, 1992). O que só aumenta a demanda por essas enzimas, principalmente as produzidas por microrganismos como as actinobactérias.

Estudos como este que comprovam e investigam a produção de enzimas celulares, como amilase, celulase e xilanase, por cepas actinobactérias que possuem alta adaptação as condições extremas, como aquelas presentes no semiárido brasileiro, são promissores, pois esse é um ambiente único.

## 2.4 Semiárido

O Semiárido Brasileiro inclui 1.262 municípios de nove estados, sendo eles Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (Figura 1). As resoluções nº 107 de 27/07/2017 e nº 115 de 23/11/2017 do Conselho deliberativo da Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE) utilizou os seguintes critérios para a delimitação do Semiárido: precipitação pluviométrica média anual igual ou inferior a 800 mm, Índice de Aridez de Thornthwaite igual ou inferior a 0,50 e percentual diário de déficit hídrico igual ou superior a 60%, considerando todos os dias do ano.

Figura 1- Delimitação do semiárido brasileiro



Fonte: SUDENE, 2017. Disponível em:

<http://antigo.sudene.gov.br/delimitacao-do-semiarido>

O Nordeste abriga a maior parte do semiárido brasileiro, os estados que mais se destacam em número de municípios são Bahia, Paraíba, Piauí e Ceará com 278, 194, 185 e

175 municípios respectivamente. O Ceará é o estado que possui a maior porcentagem (95%) do seu território ocupado pela região semiárida, já o estado de Minas Gerais possui apenas cerca de 18% do território ocupada por essa região (ASA, 2020).

É possível distinguir dois biomas no semiárido, a caatinga e o cerrado. O cerrado é o bioma com a maior reserva mundial de águas subterrâneas, que são responsáveis por abastecer três bacias hidrográficas brasileiras, Amazônica, Paraná e São Francisco (ASA, 2020). Esse bioma é popularmente conhecido como savana brasileira, sua vegetação tem fisionomias diversificadas variando desde campos a cerradões, fator relacionado aos diversos tipos de relevo, clima e solo que ocorrem na região (KLINK; MACHADO, 2005).

A caatinga é um bioma exclusivo do Brasil (ASA, 2020), abrigando uma biodiversidade única, tem como características a elevada temperatura média anual, o índice pluviométrico baixo (entre 250 e 800mm) e a irregularidade de chuvas (MAIA, 2004). Esse ecossistema é o principal da região nordeste e corresponde a cerca de 10% do território nacional (IBGE, 2012), ele aporta uma grande biodiversidade e endemismo de espécies (IBAMA, 2012).

A caatinga apresenta uma vegetação bem adaptada as condições desafiadoras do semiárido, estudos como o de Ferreira (2014) apontam que a microbiota do solo também se adaptou para sobreviver nesse ambiente em que a temperatura do solo pode alcançar até 60° C na estação seca. Por isso o presente estudo tem como interesse identificar e caracterizar actinobactérias do semiárido além de avaliar a produção enzimática.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Fazer a caracterização de cepas de actinobactérias provenientes de áreas cultivadas de Ubajara (CE).

#### **3.2 Específicos**

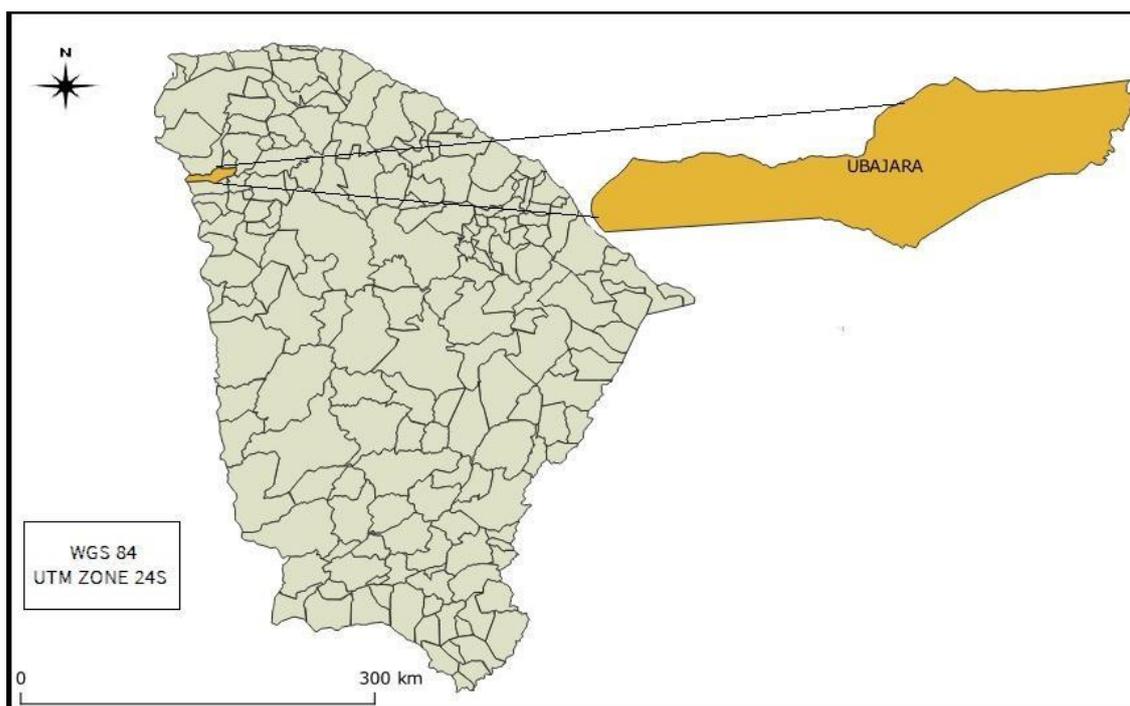
- Isolamento de cepas de actinobactérias provenientes de Ubajara.
- Caracterização cultural, enzimática e micromorfológica das cepas de actinobactérias.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área de estudo

O presente estudo foi realizado a partir de amostras de solo rizosférico armazenadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) da Universidade Federal do Ceará (UFC). As amostras foram coletadas em cinco áreas de agricultura localizadas em Ubajara (CE-Brasil) em julho de 2018, no âmbito do projeto de pesquisa do CNPQ da Chamada CNPq/ICMBio/ FAPs nº18/2017. A cidade de Ubajara está localizada geograficamente entre as coordenadas 03°51'16'' S e 40°55'16'' O (Figura 2), a uma altitude de 848 m acima do nível do mar. De acordo com a classificação de Köppen (1918), a região possui clima Aw', caracterizado como tropical chuvoso, muito quente, com chuvas predominantes nas estações do verão e do outono, com precipitação pluvial média anual de 1.483,5 mm e temperatura média de 24,6 °C (IPECE, 2017).

Figura 2 - Localização do município de Ubajara.



Fonte: BANDEIRA, 2010.

A cidade de Ubajara se encontra no bioma Caatinga (IBGE, 2019), bioma típico de clima semiárido e que possui uma vegetação adaptada a aridez do solo e a escassez de água, sua produção agropecuária é bastante diversificada, de acordo com o censo agropecuário de 2017 (IBGE) a produção agrícola desse município, de culturas anuais, é de principalmente cana de açúcar (4309 toneladas/ano), milho (1632 toneladas/ano), mandioca (662 toneladas/ano) e feijão (469 toneladas/ano) e de culturas perenes, maracujá (4014 toneladas/ano), acerola (1669 toneladas/ano) e banana 1325 (toneladas/ano). Já na pecuária a

cidade se destaca na criação de suínos e gado.

Apesar do clima da região ser classificado como um só, é possível distinguir microclimas seco e úmido, de acordo com a variação de altitude e das transformações da paisagem devido a antropização (NUNES *et al.*, 2019). Assim, foram escolhidas cinco áreas de agricultura para coleta, sendo três áreas localizadas em micro clima seco e duas no úmido.

#### **4.2. Amostragem**

As áreas de agricultura foram selecionadas das através de imagens de satélite, obtidas no programa Google Earth<sup>®</sup>. Para tanto, os pixels que apresentavam agricultura como uso do solo, foram enumerados. Em seguida, pelo método estatístico da estratificação aleatória, os *pixels* foram sorteados e os pontos de coleta definidos.

Em campo, amostras de solo rizosférico, na profundidade de 0-20 cm, foram coletadas utilizando pás adequadas, sendo todo o material de coleta desinfetado com álcool 70 °INPM e hipoclorito de sódio, antes de ser utilizado no próximo ponto. Foi realizada amostragem do tipo composta, a partir da coleta de cinco amostras simples de 200g cada (FILIZOLA; GOMES; SOUSA, 2006). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e encaminhados para o Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A localização geográfica dos pontos de coleta, bem como as culturas identificadas durante as coletas, estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1 - Pontos de coleta das amostras de solo

Ponto	Coordenadas geográficas		Culturas identificadas
A71	Latitude	-3,824717	Milho e arroz da terra
	Longitude	-40,873521	
	Latitude	-3,802534	
A95	Longitude	-40,951015	Pimentão, batata-doce. (Milho utilizado como barreira para o vento e a plantação estava rodeada por outros cultivos de hortaliças e crucíferas). Uso de adubo químico e defensivos.
	Latitude	-3,794448	
A92	Longitude	-40,922505	Maracujá com chuchu em meio a banana e hortaliças (uso de agroquímicos)
	Latitude	-3,735659	
A61	Longitude	-40,872417	Mamão, banana e hortaliça (cultivo irrigado)
	Latitude	-3,817644	
A74	Longitude	-40,834662	Milho, feijão e mandioca
	Latitude	-3,817644	

Fonte: elaborado pelo autor.

### 4.3. Análises químicas e físicas do solo

As análises foram realizadas por Cunha (dados não publicados) no Laboratório de Química do Solo do Departamento de Ciências do Solo (DCS) da Universidade Federal do Ceará (UFC), e os dados foram previamente disponibilizados.

As amostras de solo foram analisadas quanto a pH e Condutividade elétrica (CE). Ainda, foram determinados os teores de Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Sódio (Na), Potássio (K), Fósforo disponível (P), Ferro (Fe), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Manganês (Mn), Acidez potencial, Carbono orgânico (C), Matéria orgânica e Nitrogênio (N), conduzidas de acordo com Teixeira *et al.*, (2017). A determinação de Enxofre (S), ocorreu conforme metodologia proposta em Cantarella e Prochnow (2001).

Para análise de pH, 10 g da amostra de solo foram adicionados a 25 mL de água destilada. A suspensão foi, então, homogeneizada e submetida a descanso por uma hora. Em seguida, utilizando um pHmetro de bancada calibrado, o pH da suspensão foi determinado.

Para análise da condutividade elétrica das amostras, foi utilizado o extrato de saturação, através de um condutivímetro, calibrado, com escala de leitura direta em  $\text{dS.m}^{-1}$  a 25 °C.

Os teores de Ca e Mg foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e Na e K por fotometria de chama. Para tanto, 12,5g de Terra Fina Seca ao Ar (TFSA) foram adicionados a 125 mL de solução de acetato de amônio (1N), com pH ajustado a 7,0, por 5 min em agitador mecânico. Em seguida, a suspensão foi filtrada, e submetida a leitura em

cada equipamento.

A concentração de P nas amostras de solo foi determinada utilizando 50 mL da solução de extração Mehlich 1 (HCl 0,05 N e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,025 N), adicionada a 5 g de TFSA, por 5 minutos em agitador mecânico. Passado o tempo de agitação, o extrato foi filtrado e uma alíquota de 5 mL foi retirada, sendo, a esse volume, adicionados 10 mL de solução ácida de molibdato de amônio diluída, além de 30 mg de ácido ascórbico em pó, como redutor. Após agitação por 2 minutos e descanso por 1 hora, foram feitas leituras em fotocolorímetro, usando comprimento de onda de 660 µm.

Para determinação dos teores de Fe, Cu, Zn e Mn foram adicionados 10 g de TFSA em 50 mL da solução de Mehlich 1 durante 5 minutos em agitador mecânico. Em seguida o extrato foi filtrado e realizada a leitura em espectrofotometria de absorção atômica.

Para análise da Acidez Potencial do solo, foram pesados 5 g de TFSA, acrescidos de 75 mL de solução de acetato de cálcio (0,5 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,0). A suspensão foi submetida a agitação durante 10 minutos. Em seguida, a suspensão permaneceu em repouso até o dia seguinte. Então, foram retirados 25 mL do sobrenadante obtido e a esse volume, foram adicionadas três gotas da solução de fenolftaleína e titulado com solução padronizada de 0,025 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH até o desenvolvimento da cor rósea persistente.

A concentração de Carbono Orgânico no solo foi determinada por oxidação da matéria orgânica do solo com dicromato de potássio 0,4 N (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) em presença de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), passando por aquecimento em chapa por 5 minutos. Após aquecimento, foram adicionados 80 mL de água destilada, 2 mL de ácido fosfórico P.A (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e 3 gotas de difenilamina ((C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NH), em seguida titulação com sulfato ferroso amoniacal 0,1 N (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O).

O cálculo do carbono foi realizado através da equação:

$$C \text{ (g/kg)} = (40 - \text{volume gasto}) * f * 0,6, \text{ onde:}$$

f = 40/volume sulfatos ferroso gasto na prova em branco.

A matéria orgânica do solo foi calculada através da equação:

$$\text{Matéria orgânica (g/kg)} = C \text{ (g/kg)} * 1,724$$

Para obtenção dos teores de N nas amostras de solo, foram pesados 1,0 g de TFSA, adicionados 1,1 g da mistura catalisadora e 4 mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Os tubos foram levados à capela e digeridos em bloco digestor à temperatura de 150 °C por 1 hora, posteriormente ocorreu destilação e titulação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A concentração de N, foi

então calculada, em g.Kg<sup>-1</sup>:

$$N = (Mac * 28 * Vac) / m * 1000, \text{ onde:}$$

Mac = concentração da solução padronizada de ácido sulfúrico, em mol L<sup>-1</sup>; Vac = volume da solução padronizada ácido sulfúrico gasto na titulação, em mL e m = massa da amostra de solo digerida, em mg.

O teor de S foi determinado a partir da pesagem de 5 g de TFSA adicionado de 25mL da solução extratora de Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (0,01 mol.L<sup>-1</sup>), para cada amostra de solo. A suspensão resultante permaneceu, então, em repouso por 30 min e submetida a filtração após esse intervalo. Em seguida, 10 mL desse extrato foi adicionado de 1mL da solução-semente ácida (20 mg/L de S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Cinco minutos antes da leitura, foram adicionados aproximadamente 0,5 g de cristais de BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O retidos em peneiras de 20 e 60 mesh. Após a solubilização dos cristais, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 420 nm.

As análises granulométricas foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Filho e Magalhães (2008). Foi utilizado o método da pipeta, por conta de sua precisão. Para obtenção dos teores de areia, argila e silte do solo das áreas amostrais, 20g de TFSA de cada amostra de solo foram misturados com 100 mL de água destilada, 10 mL de hexametáfosfato de sódio e a suspensão foi permaneceu em repouso por 15h. Passado esse período, as amostras passaram por agitador e peneira de 0,0053 mm colocada sobre cilindro de sedimentação. Após coleta do material peneirado e demais procedimentos para obtenção dos teores de argila pelo cilindro de sedimentação, as amostras foram levadas à estufa a 105 °C. Os cálculos usados foram:

$$\text{Porcentagem de argila} = [(\text{peso da argila} + \text{dispersante}) - \text{dispersante}] * 200 * \text{fator de correção (f)}.$$

$$\text{Porcentagem de areia} = \text{peso da areia} * 5 * f.$$

$$\text{Porcentagem de silte} = 100 - (\% \text{ de argila} + \% \text{ de areia}).$$

#### 4.4. Inoculação e isolamento das actinobactérias

Para obtenção das actinobactérias cultiváveis nas amostras de solo, foi utilizada a técnica *Spread Plate*. Para tanto, foi realizada a pesagem, entre chamas, de 10 g de solo em tubo *Falcon* estéril. Então, assepticamente, o solo pesado foi transferido para um Erlenmeyer

de 500 mL e foi adicionado 90 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%), constituindo a proporção 1:10, para posterior agitação a 120 rpm por 30 minutos. Passado esse período, em capela de fluxo laminar, foi realizado o procedimento das diluições seriadas, retirando 1 mL da diluição  $10^{-1}$  para um tubo de ensaio e completou-se com 9 mL de solução salina estéril 0,85%, constituindo assim a diluição  $10^{-2}$ , desta foram retirados 1 mL para outro tubo de ensaio que também foi completado com 9 mL de solução salina, esse procedimento foi repetido até a obtenção da diluição  $10^{-5}$ , garantindo a homogeneização em cada tubo, com a utilização de um vórtex de agitação.

Em seguida, 100  $\mu$ L de cada uma das diluições foi espalhado, com alça de Drigalski, em placas de Petri contendo meio para crescimento de actinobactérias (Caseína Agar Dextrose – CDA), cuja composição está apresentada na Tabela 2 (KUSTER; WILLIAMS, 1964, ARIFUZZAMAN; KHATUN; RAHMAN, 2010). As inoculações foram realizadas em triplicatas e as placas foram mantidas em incubadora a  $28 \pm 2$  °C por 10 dias (SHAIKH *et al.*, 2013). Após esse período, verificou-se em quais diluições havia crescido um número significativo de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), entre 30 e 300, e foram selecionadas colônias com características culturais mais diversas para isolamento, através de estrias em placas de Petri contendo meio CDA.

Tabela 2 - Composição do meio CDA.

<b>Substância</b>	<b>Concentração</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
Dextrose	2 g/L
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g/L
Caseína	0,2 g/L
Ágar	15 g/L
Nistatina	0,5 g/L

Fonte: KUSTER; WILLIAMS, 1964.

#### 4.5 Caracterização dos isolados

Após 10 dias de crescimento em meio CDA em incubadora a  $28 \pm 2$  °C, as 30 colônias selecionadas foram designadas com a sigla TUB seguida de sua respectiva numeração (Tabela 3).

Tabela 3 - Nomenclatura das colônias conforme a área

Área	Isolados
A71	TUB 1, TUB 2, TUB 3, TUB 4, TUB 5, TUB6
A95	TUB 7, TUB 8, TUB 9, TUB 10, TUB 11, TUB 12
A92	TUB 13, TUB 14, TUB 15, TUB 16, TUB 17, TUB 18
A61	TUB 19, TUB 20, TUB 21, TUB 22, TUB 23, TUB 24
A74	TUB 25, TUB 26, TUB 27, TUB 28, TUB 29, TUB 30

Fonte: elaborado pelo autor.

##### 4.5.1 Coloração de Gram

A fim de avaliar a pureza das culturas de actinobactérias, foi realizada a coloração de Gram adaptando-se a metodologia de Kern e Blewins (1999). Para cada isolado, em condições assépticas, pipetou-se uma gota de solução salina (NaCl a 0,85%) sobre uma lâmina de microscopia estéril. Então, com uma alça de inoculação, foi retirada uma parte de uma colônia e realizado um esfregaço, até a completa secagem da solução salina. Em seguida, o esfregaço foi fixado na lâmina através de rápida passagem em chama.

Procedeu-se, então, com o processo de coloração do esfregaço. Primeiro, a lâmina foi coberta com solução fenicada de cristal de violeta por um minuto e o excesso de corante foi retirado. Em seguida, foi adicionado lugol, como agente de fixação, sobre a lâmina, por mais um minuto e após esse tempo lavou-se em água corrente. Então, o corante não fixado foi removido com solução de álcool-cetona. Por fim, a lâmina foi coberta com solução de fucsina básica, lavada após 30 segundos. Após a secagem das lâminas, partiu-se para a visualização em microscópio óptico Zeiss Axioplan<sup>®</sup> em objetiva de imersão (aumento de 100 vezes).

##### 4.5.2 Cor do micélio aéreo e reverso

Para fazer a caracterização macromorfológica dos isolados, as 30 cepas de actinobactérias foram inoculadas na forma de dois *spots* por placa contendo o meio CDA e foram incubadas em a  $28$  °C  $\pm$  2 por 10 dias. Após o período de crescimento, foram descritas de acordo com as cores do micélio aéreo e do reverso da colônia conforme a cartela de cores de Wink (2012), baseada na carta de cores *RAL color charts*. Posteriormente, foi realizado o

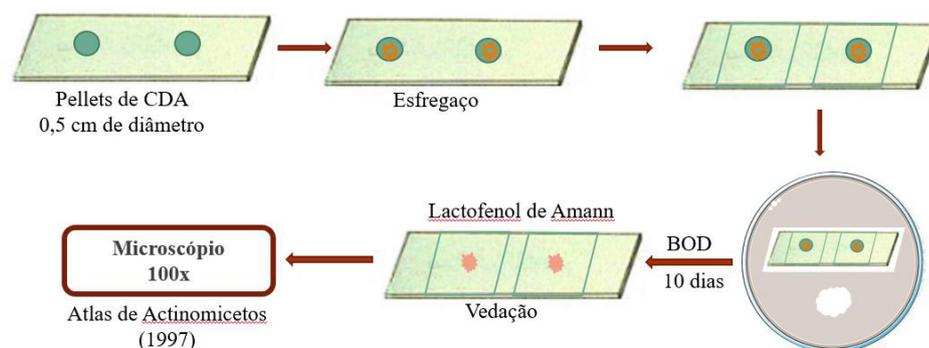
registro fotográfico de cada colônia isolada e os dados foram agrupados conforme a matriz da cor.

#### 4.5.3 Microcultivo

A análise micromorfológica foi realizada conforme uma adaptação da metodologia de Kern e Blewins (1999), demonstrado na figura 3. Em condições assépticas, com o auxílio da extremidade de maior diâmetro de uma pipeta Pasteur, foram retirados *pellets* de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro de meio CDA, vertido em placa anteriormente. Com auxílio de uma pinça, dois pellets de meio foram transferidos para uma lâmina estéril e identificada com o nome da cepa, posicionada dentro de uma placa de Petri. Então, com uma alça de inoculação, foi realizado o esfregaço das colônias bacterianas ao redor dos *pellets*. Em seguida foram adicionadas lamínulas estéreis sobre cada *pellet* fazendo uma leve pressão com a pinça. Cada uma das placas continha um algodão umedecido para garantir a hidratação do meio de cultivo.

As placas contendo as lâminas, permaneceram em câmara B.O.D. a 28 °C por um período de 10 dias. Passado o período de crescimento, em uma capela de exaustão, cada lamínula foi transferida para uma nova lâmina estéril e identificada contendo uma gota de corante Lactofenol de Amann. As lamínulas foram então vedadas com esmalte incolor. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico Zeiss Axioplan até o aumento de 100x e para a identificação dos gêneros fez-se uma comparação com as imagens presentes no Atlas de Actinomicetos, publicado pela Sociedade Japonesa de Actinomicetos (1997).

Figura 3 - Etapas para a realização do microcultivo.



Fonte: elaborado pelo autor.

## 4.6. Atividade enzimática

### 4.6.1. Atividade amilolítica

Para avaliar a capacidade de hidrólise do amido, foram realizados dois ensaios com a finalidade de garantir réplicas ao teste. Os ensaios foram executados da seguinte forma: Cada uma das 30 cepas de actinobactérias foi inoculada em duas placas de Petri na forma de quatro *spots*, em cada placa, contendo o meio de cultivo ágar amido (Tabela 4) com pH entre 6,5 e 7,1. Depois de inoculadas, as placas permaneceram em câmara de crescimento B.O.D. a 28 °C  $\pm$  2 por 10 dias. Após esse tempo de incubação, foi realizada a mensuração do diâmetro (em milímetros) de cada uma das colônias formadas pelos *spots*, como auxílio de um paquímetro. Para a revelação da zona de hidrólise, pipetou-se 10 mL de lugol (1 g de iodo e 2 g de iodeto de potássio para cada 300 mL de água destilada), e então foi possível observar se houve ou não a descoloração do meio com corante devido a hidrólise do amido formando um halo claro bem contrastante ao redor da colônia. O halo de hidrólise também foi mensurado (em milímetros) utilizando um paquímetro (ALARIYA *et al.*, 2013; BUZZINI; MARTINI, 2002).

Tabela 4 - Composição do meio Amido

Substância	Concentração
Peptona	10 g/L
Extrato de carne	3 g/L
NaCl	5 g/L
Amido	2 g/L
Ágar	15 g/L

Fonte: ALARIYA *et al.*, 2013; BUZZINI; MARTINI, 2002

### 4.6.2. Atividade celulolítica

Para a análise da produção da enzima celulase foram realizados dois ensaios, que conduzidos da seguinte forma: Cada uma das 30 cepas de actinobactérias foi inoculada em duas placas de Petri na forma de quatro *spots*, em cada placa, contendo meio de cultivo ágar suplementado com carboximetilcelulose (CMC) com pH 6  $\pm$ 0,2, cuja composição está descrita na Tabela 5. Depois de inoculadas, as placas permaneceram em câmara de crescimento B.O.D. a 28 °C  $\pm$  2 por 10 dias. Após esse tempo de incubação, foi realizada a mensuração do diâmetro (em milímetros) de cada uma das colônias formadas pelos *spots*, como auxílio de um paquímetro. Para a revelação da zona de hidrólise, foi adicionado as placas 10 mL de solução de vermelho congo a 0,5% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, foi descartado o excesso da solução e foram adicionados em cada placa 10

mL de NaCl (2M), deixando reagir por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a retirada da solução salina, foram observados a presença e ausência de halos de hidrólise em torno das colônias, seguido da medição, com paquímetro, do diâmetro (em milímetros) de cada halo formado (COURI; FARIAS, 1995; HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977).

Tabela 5 - Composição do meio CMC

<b>Substância</b>	<b>Concentração</b>
Carboximetilcelulose	5 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g/L
KCl	0,5 g/L
NaNO <sub>3</sub>	3 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/L
Ágar	15 g/L

Fonte: COURI; FARIAS, 1995; HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977

#### 4.6.3. Atividade xilanolítica

Para a análise da hidrólise de xilana foram realizados dois ensaios, com a finalidade de garantir réplicas ao teste. Cada um dos ensaios foi executado da seguinte forma: Cada uma das 30 cepas de actinobactérias foi inoculada em duas placas de Petri na forma de quatro *spots*, em cada placa, contendo meio xilana (Tabela 6) com pH 6,5 ±0,2. Depois de inoculadas, as placas permaneceram em câmara de crescimento B.O.D. a 28 °C ± 2 por 10 dias. Após esse tempo de incubação, foi realizada a mensuração do diâmetro (em milímetros) de cada uma das colônias formadas pelos *spots*, como auxílio de um paquímetro. Para a revelação da zona de hidrólise, foi adicionado as placas 10 mL de solução de vermelho congo a 0,5% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, foi descartado o excesso da solução e foram adicionados em cada placa 10 mL de NaCl (2M), deixando reagir por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a retirada da solução salina, foram observados a presença e ausência de halos de hidrólise em torno das colônias, seguido da medição, com paquímetro, do diâmetro (em milímetros) de cada halo formado (KUMAR *et al.*, 2012).

Tabela 6 - Composição do meio Xilana

<b>Substância</b>	<b>Concentração</b>
Xilana	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
Extrato de Levedura	1 g/L
NaNO <sub>3</sub>	0,5 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/L
Ágar	15 g/L

Fonte: KUMAR *et al.*, 2012

#### **4.6.4. Determinação do índice enzimático**

A atividade enzimática foi determinada pelo índice enzimático (IE) que relaciona os diâmetros do halo de degradação e da colônia, expresso na equação (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975):

$$IE = Dh / Dc$$

Sendo, Dh o diâmetro em mm do halo de hidrólise e Dc o diâmetro em mm da colônia das actinobactérias.

#### **4.6.5 Análise Estatística**

Os resultados dos testes enzimáticos foram submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ) e, posteriormente, ao teste de médias Tukey. A análise dos dados foi realizada no software SISVAR versão 5.6 e os gráficos foram plotados no Microsoft Excel 2016.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção e seleção dos isolados

Após o período de incubação a escolha das colônias foi realizada nas diluições de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Foram obtidas 28 cepas de actinobactérias.

### 5.2 Análises de solo

As amostras de solo coletadas nas seis áreas de estudo diferiram em suas características químicas e físicas (Tabelas 7, 8 e 9). O pH do solo nas áreas amostradas variou entre 4,8 (A 71) e 6,0 (A 95) e a matéria orgânica de 22,03 g/kg (A 95) a 45,41 g/kg (A 74). Arifuzzaman, Khatun e Rahman (2010) afirmaram que o pH, a concentração de matéria orgânica, a aeração, a temperatura e o teor de umidade do solo influenciam diretamente a população de actinobactérias em número e tipo de espécies diferentes. Já Nannipieri *et al.* (2003) relataram que propriedades como tamanho das partículas, pH, CTC e teor de matéria orgânica afetam de duas formas a estrutura da comunidade microbiana; diretamente, por fornecer um habitat específico que seleciona microrganismos, e indiretamente, por influenciar o funcionamento e a exsudação da raiz das plantas.

As áreas A 71 e A 85 possuem pH entre 4 e 5 indicando presença de alumínio trocável reforçado pelos valores de acidez potencial (H+Al). O início do processo de mineralização microbiana é diretamente relacionado a disponibilidade de carbono no solo, que é diminuída em baixos pH. Cardoso e Freitas (1992) relataram que a acidez é uma das características químicas do solo que mais atua no aumento da atividade biológica, e, portanto, na decomposição da matéria orgânica. Silva *et al.* (2012) atribuíram uma maior densidade de actinobactérias em solos do Cerrado brasileiro cujo pH e concentração de matéria orgânica eram levemente inferiores.

Os baixos teores de cálcio, magnésio e potássio na área A71 indicam um solo mais intemperizado. A área A92 apresentou a soma Ca+Mg igual a 3,9 cmol<sub>c</sub>/kg. Mayfield *et al.* (1972) relacionaram as maiores populações de actinobactérias encontradas no seu estudo à solos com maiores teores de cálcio e magnésio, pelo fato desses cátions favorecerem o estabelecimento destas populações. A área A61 apresentou um valor bem superior de fósforo 20,14 g/kg. Araújo *et al.* (2014) estudando comunidades bacterianas do solo em terras

restauradas concluiu que as bactérias se correlacionaram positivamente com os altos níveis de P.

Tabela 7- Caracterização química do solo coletado nas áreas de agricultura, Ubajara (CE).

<i>Área</i>	<i>pH</i>	<i>CE</i>	<i>C</i>	<i>MO</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>H+Al</i>
-----	--Água--	--mS/cm--	-----g/kg-----				-----cmol/kg-----					
A 71	4,8	0,2	23,01	39,67	8,50	5,43	0,15	0,5	0,6	0,35	0,08	0,75
A 95	6,0	2,5	12,78	22,03	10,15	8,55	0,82	2,5	0,6	1,0	0,20	0,34
A 92	5,5	2,0	17,70	30,51	16,55	6,69	0,74	2,4	1,5	0,6	0,1	0,48
A 61	5,8	0,4	15,00	25,86	9,40	20,14	0,14	2,3	1,1	0,4	0,3	0,27
A 74	5,9	0,1	26,34	45,41	8,35	8,19	0,13	1,4	1,2	0,3	0,1	0,48
A 85	4,9	3,1	14,70	25,34	10,05	14,17	0,82	2,2	0,8	2,2	0,1	0,48

Fonte: CUNHA (dados não publicados).

Na tabela 8, verifica-se que a área A71 apresentou os menores teores de cobre e zinco, 0,0545 e 0,4435 mg/Kg, respectivamente. Silva *et al.* (2013), ao estudarem solo do Cerrado brasileiro constatou alta prevalência de actinobactérias em solos com pouca disponibilidade dos micronutrientes como boro, cobre, molibdênio e zinco.

Tabela 8 - Quantificação de micronutrientes no solo coletado nas áreas de agricultura, Ubajara (CE).

<i>Áreas</i>	<i>Fe</i>	<i>Cu</i>	<i>Mn</i>	<i>Zn</i>
-----	-----mg/ Kg-----			
A 71	56,1405	0,0545	29,1485	0,4435
A 95	21,2410	1,8735	14,8220	10,7010
A 92	15,2075	3,0510	25,0585	19,4215
A 61	93,8695	0,2240	12,1225	1,7340
A 74	4,6810	0,2000	31,6010	1,4835
A 85	13,0370	0,2445	25,7405	3,8535

Fonte: CUNHA (dados não publicados).

As áreas A95, A92 e A85 possuem solos de textura arenosa (Tabela 9), caracterizados por teor de areia maior que 70% e de argila menor que 15%, as demais áreas são classificadas

na textura média. Nannipieri et al. (2003) concluíram que a textura do solo afeta a microbiota devido a adsorção, pela fase sólida, de moléculas de importância biológica, como proteínas e ácidos nucleicos, e exsudados da raiz, limitando-os para os microrganismos. Silva *et al.* (2013) observaram uma maior densidade de actinobactérias em solos arenosos do Cerrado brasileiro.

Tabela 9 - Caracterização física do solo coletado nas áreas de agricultura, Ubajara (CE).

<i>Área</i>	<i>Areia</i>	<i>Silte</i>	<i>Argila</i>
	-----%		
A 71	67,86	19,04	13,10
A 95	83,53	7,30	9,17
A 92	77,06	12,37	10,57
A 61	59,13	24,14	16,73
A 74	67,84	10,95	21,21
A 85	76,41	11,21	12,38

Fonte: CUNHA (dados não publicados).

### 5.3 Coloração de Gram

Determinou-se que todas as cepas eram Gram-positivas apresentando uma coloração roxa (Figura 4). As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, possuindo em sua parede celular uma espessa camada de peptidoglicano (GENILLOUD *et al.*, 2011).

Figura 4 - Coloração de Gram da cepa TUB 17 visualizada no aumento 100x.



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 5.4 Caracterização cultural

Diversas cores foram observadas no micélio aéreo (Figura 5), havendo um predomínio da coloração branca nas áreas A95, A61 e A74 e da coloração cinza nas áreas A71 e A92. Cada área apresentou variações de três cores.

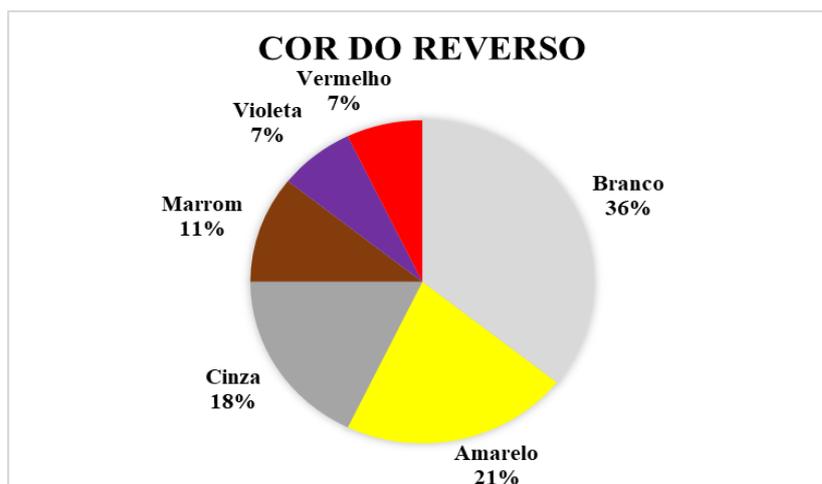
Figura 5 - Visualização geral da diversidade de cores do micélio aéreo das cepas de actinobactérias oriundas do Parque Nacional de Ubajara, Ceará.



Fonte: elaborado pelo autor.

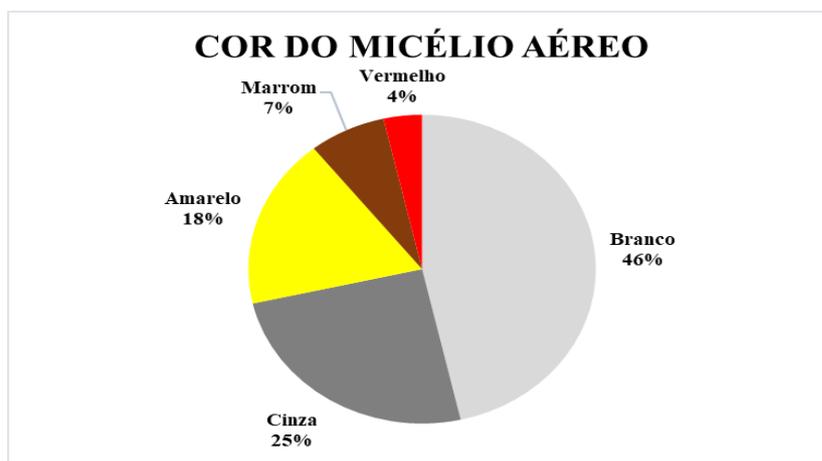
A cor das actinobactérias é utilizada como critério de classificação e identificação de gênero e em estudos taxonômicos (AUGUSTINE *et al.*, 2013; BARKA *et al.*, 2016). Estas cores são descritas em tons de azul, violeta, vermelho, rosa, amarelo, verde, marrom e preto, que podem estar dissolvidos no meio ou retidos no micélio (AMAL *et al.*, 2011). Shouche e Bhati (2019) registraram que a cor do micélio aéreo das actinobactérias pode variar de branco, creme, calcário, marrom, cinza a rosado e violeta e do micélio reverso de marrom, amarelo a laranja. Silva *et al.* (2019) ao caracterizarem cepas provenientes de Quixadá, Ceará, observaram o predomínio das cores marrom, cinza e branca. Medeiros *et al.* (2018), ao caracterizar culturalmente cepas de actinobactérias provenientes do semiárido, registraram a predominância das cores cinza, creme e branco. Neste estudo foi observado o predomínio das cores branca, amarela e cinza conforme mostram os gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 - Distribuição dos isolados conforme cor do reverso.



Fonte: elaborado pelo autor.

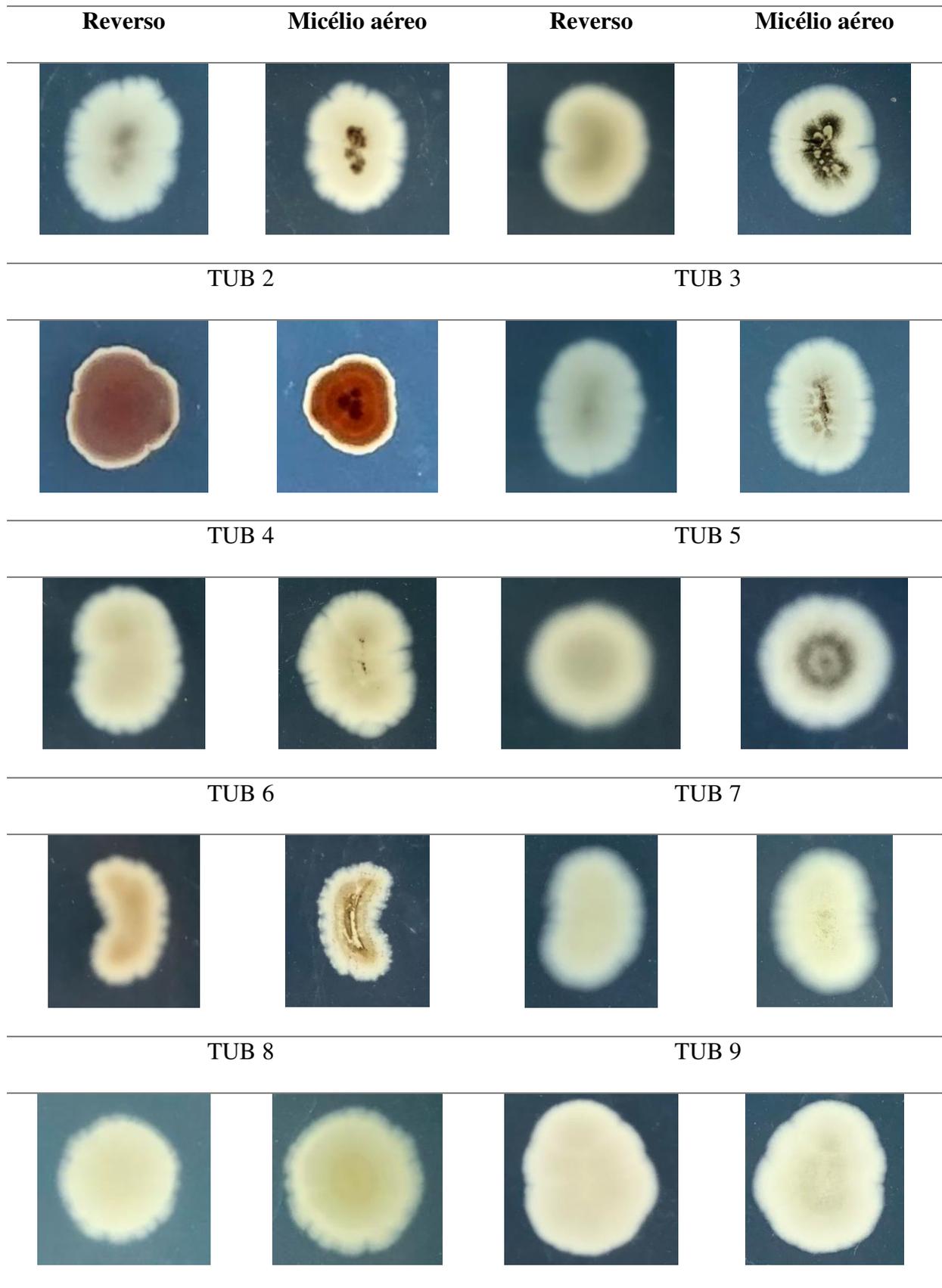
Gráfico 2 - Distribuição dos isolados conforme cor do micélio aéreo.



Fonte: elaborado pelo autor.

A diversidade cultural das cepas provenientes do solo de seis áreas de agricultura de Ubajara, pode ser observada pelo registro fotográfico, que abrange imagens das colônias isoladas (Figura 6). O registro fotográfico permite comparar as cores com a produção dos carotenoides e taxonomia das culturas, auxiliando a seleção de colônias (ROMERO *et al.*, 2012). Essa ferramenta já foi utilizada por diversos autores como Silva *et al.* (2019) e Medeiros *et al.* (2018) para classificar as cepas ao nível de gênero, no presente estudo essa classificação será realizada utilizando a coloração das cepas juntamente com a análise das microestruturas obtidas no ensaio de microcultivo.

Figura 6 - Registro fotográfico das colônias isoladas de 28 cepas de actinobactérias.



---

TUB 11

TUB 12

---

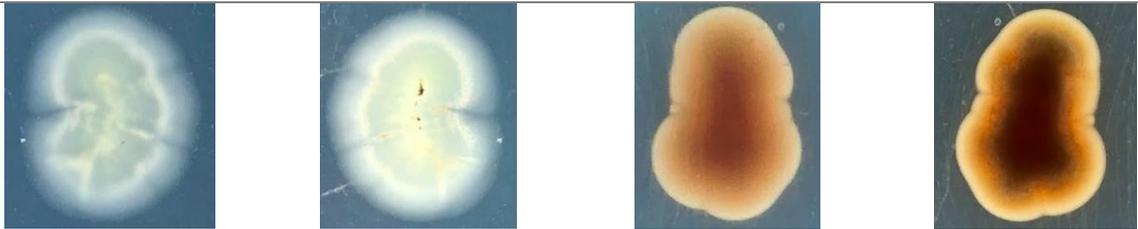


---

TUB 13

TUB 14

---

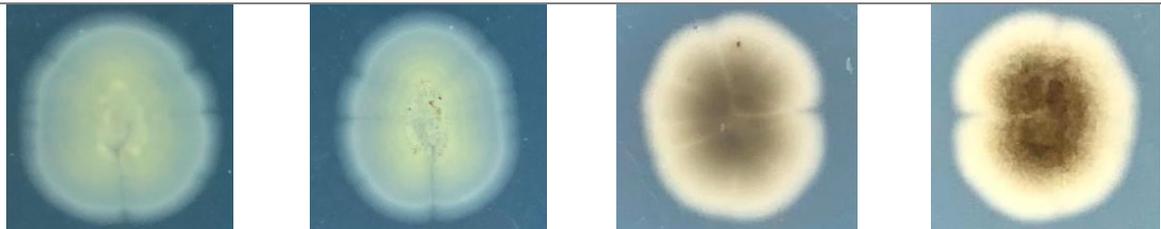


---

TUB 15

TUB 16

---

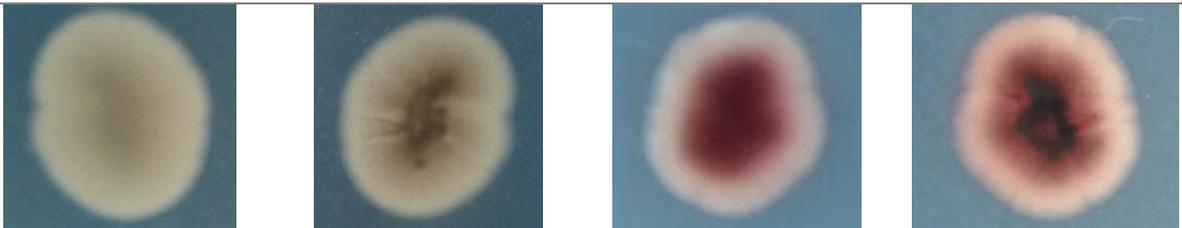


---

TUB 17

TUB 18

---

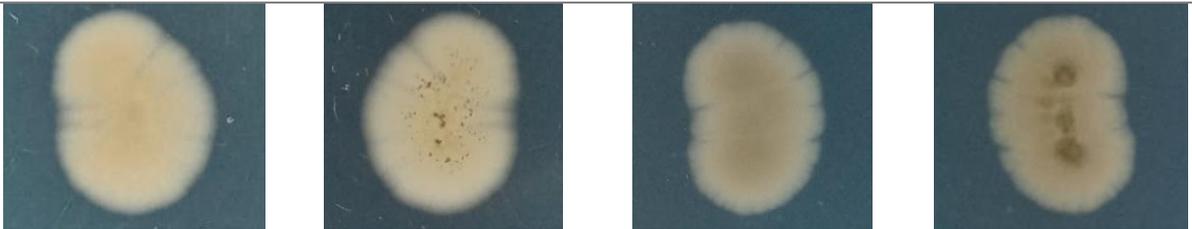


---

TUB 19

TUB 20

---



---

TUB 21

TUB 22

---



Foram registradas 29 variações, com diferentes números de RAL, das cores branca, cinza, amarelo, marrom, vermelho e violeta. Essa diferença demonstra a diversidade cultural das actinobactérias, pois a produção de pigmentos contribui para a sobrevivência e competitividade desse grupo, apesar de não ser essencial (SHARMA, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

## 5.5 Caracterização enzimática

### 5.5.1 Atividade amilolítica

O halo indicador da degradação do amido (Figura 7) foi observado em 100% das cepas analisadas (28). Alves *et al.* (2016) estudando 39 isolados de actinobactérias provenientes do semiárido do Baixo Acaraú, Ceará, determinou que 92,3% das cepas produziam amilase. Já Silva *et al.* (2015) obteve o valor de 82% com cepas de actinobactérias originadas da região semiárida de Ubajara, Ceará. Os altos percentuais de positividade obtidos demonstram o potencial de síntese de amilase pelas actinobactérias no semiárido cearense destacando a importância de estudos sobre esse grupo bacteriano na Caatinga.

Figura 7 - Halo de hidrólise de amido na cepa TUB 13 isolada da área de agricultura A92 localizada em Ubajara, Ceará.



Fonte: elaborado pelo autor.

O diâmetro da colônia variou de 3,71 mm (TUB 8) a 18,26 mm (TUB 14). Já o diâmetro do halo teve o valor mínimo de 15,36 mm (TUB 22) e máximo de 37,42 (TUB 15). A Tabela 10 mostra os diâmetros dos halos das colônias e de inibição e os respectivos valores do IE das cepas de actinobactérias isoladas. Observou-se que duas amostras (TUB 1 e TUB 10) analisadas tratavam-se de fungos, portanto a análise enzimática destas foi descartada.

Tabela 10 - Índice enzimático (IE) de amilase de cepas de actinobactérias isoladas de áreas de agricultura do Parque Nacional de Ubajara, no Ceará. Os resultados correspondem à média de oito repetições.

Cepas de actinobactérias	Diâmetro da colônia (mm)	Diâmetro do halo (mm)	Índice enzimático
TUB 2	7,62	35,38	4,64 ± 0,37
TUB 3	6,69	18,21	2,72 ± 0,19
TUB 4	8,34	22,66	2,72 ± 0,34
TUB 5	8,05	30,87	3,84 ± 0,27
TUB 6	6,91	16,22	2,35 ± 0,32
TUB 7	4,10	21,13	5,15 ± 1,01
TUB 8	3,71	20,32	5,48 ± 1,53
TUB 9	8,66	31,59	3,65 ± 0,70
TUB 11	9,83	27,31	2,78 ± 0,44
TUB 12	6,81	30,29	4,45 ± 0,62
TUB 13	7,28	31,83	4,37 ± 0,26
TUB 14	18,26	28,86	1,58 ± 0,10
TUB 15	7,86	37,42	4,76 ± 0,80
TUB 16	7,37	35,54	4,82 ± 0,46
TUB 17	6,59	36,16	5,49 ± 0,63
TUB 18	4,72	27,14	6,03 ± 1,39
TUB 19	6,78	22,49	3,32 ± 0,28
TUB 20	7,15	21,01	2,94 ± 0,40
TUB 21	7,54	23,65	3,14 ± 0,42
TUB 22	7,83	15,36	1,96 ± 0,11
TUB 23	8,19	17,88	2,18 ± 0,19
TUB 24	10,07	19,25	1,91 ± 0,12
TUB 25	6,67	23,45	3,52 ± 0,40
TUB 26	9,21	25,37	2,76 ± 0,68
TUB 27	9,30	23,18	2,49 ± 0,21
TUB 28	6,47	26,36	4,07 ± 0,94
TUB 29	10,24	30,18	2,95 ± 0,16
TUB 30	9,50	34,22	3,60 ± 0,34

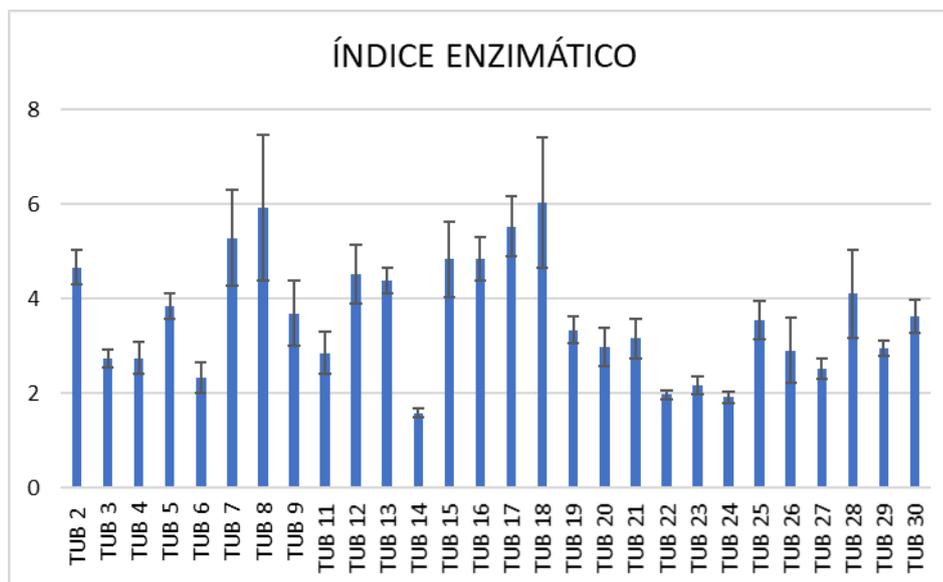
(-) ausência de halo de hidrólise

Fonte: elaborado pelo autor.

A capacidade de produção de enzimas hidrolíticas é dependente do habitat em que a actinobactéria está inserida (SAKURE *et al.*, 2015), a atividade enzimática já foi registrada em solo: da catinga (ALVES *et al.*, 2016), da Amazônia (OLIVEIRA, 2015), do cerrado brasileiro (SILVA, 2013) e da Mata Atlântica (JESUS, 2013). Nesse contexto, destaca-se o papel das actinobactérias no ciclo do Carbono possuindo a capacidade de hidrolisar o amido nos mais diversos ecossistemas.

O índice enzimático das 28 cepas de actinobactérias amilase positiva apresentou significativas variações ( $p < 0,05$ ). A cepa TUB 18 destacou-se com o maior IE, correspondendo a 6,03, enquanto a cepa TUB 14 apresentou o menor valor de IE (1,58) (Gráfico 3).

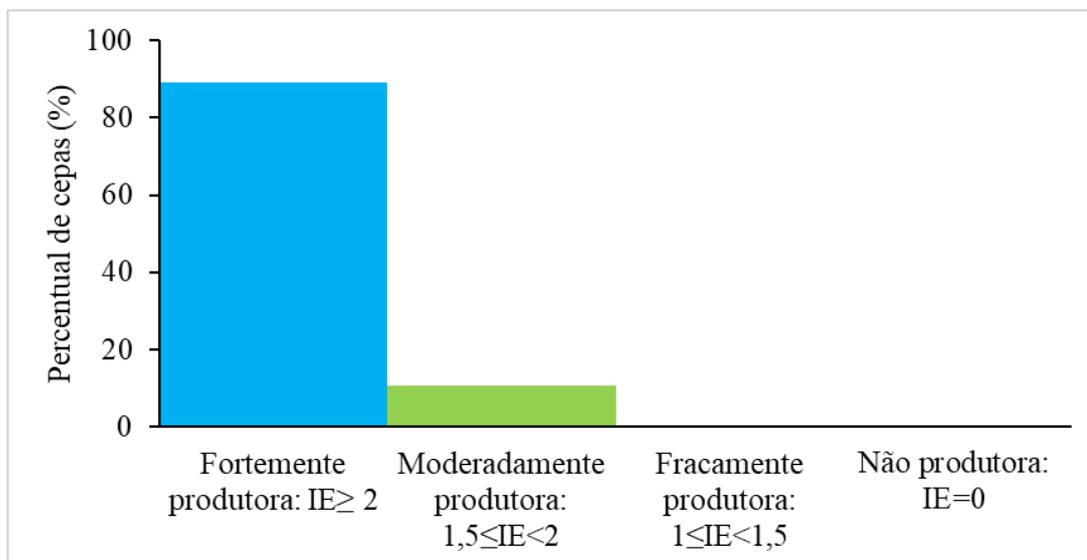
Gráfico 3 - Índice amilolítico de actinobactérias de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará.



Fonte: elaborado pelo autor.

Utilizou-se a escala proposta por Silva *et al.* (2015) para a classificação das cepas de actinobactérias isoladas de áreas de agricultura do Parque Nacional de Ubajara quanto ao potencial para produção de amilase. No presente estudo, cerca de 88,29% das cepas de actinobactérias (25 cepas), foram classificadas como fortemente produtoras de amilase com  $IE \geq 2$  e três cepas (TUB 14, TUB 22, TUB 24) como moderadamente produtoras com  $1,5 \leq IE < 2$  (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Categorização das cepas de actinobactérias provenientes de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará, quanto ao índice amilolítico.



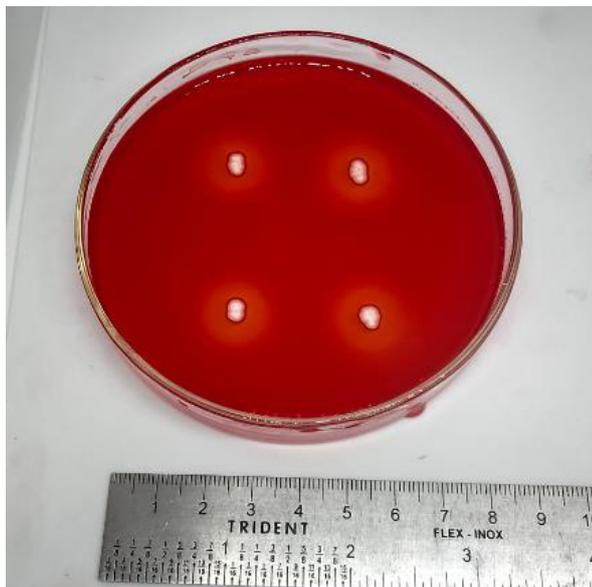
Fonte: elaborado pelo autor.

Silva *et al.* (2015), obtiveram um valor bastante inferior (60,7%) de cepas fortemente produtoras de amilase com 28 isolados também originados de Ubajara (CE), embora isto dificulte a comparação dos resultados obtidos no presente estudo, reforçam a pertinência do mesmo. O elevado percentual de cepas de actinobactérias classificadas como fortemente produtoras de amilase nesse estudo é semelhante ao encontrado por Alves *et al.* (2016), que ao estudarem 39 cepas provenientes de um perímetro irrigado do Baixo Acaraú, Ceará, obtiveram aproximadamente 80% de cepas com índice enzimático superior a 2, confirmando o potencial das actinobactérias na produção de amilase.

### 5.5.2 Atividade celulolítica

O halo indicador de atividade celulolítica (Figura 8) foi observado em 17 cepas, 60,71% das cepas analisadas. Em 39,29% não houve evidência de produção da enzima celulase (TUB 2, TUB 3, TUB 5, TUB 6, TUB 14, TUB 19, TUB 21, TUB 22, TUB 25, TUB 28, TUB 29).

Figura 8 - Halo de hidrólise de amido na cepa TUB 26 isolada da área de agricultura A74 localizada em Ubajara, Ceará.



Fonte: elaborado pelo autor.

Silva *et al.* (2015) avaliando 28 cepas de actinobactérias do Parque Nacional de Ubajara, no Ceará, reportaram atividade celulolítica em 75%, um valor superior ao do presente trabalho, isso provavelmente se deu pelo fato das amostras de solo serem provenientes de áreas de agricultura, ou seja, áreas submetidas ao estresse antrópico.

O diâmetro da colônia variou de 2,34 mm (TUB 18) a 9,43 mm (TUB 19). Já o diâmetro do halo teve o valor mínimo de 9,00 mm (TUB 12) e máximo de 34,53 mm (TUB 17). A Tabela 11 mostra os diâmetros dos halos das colônias e de inibição e os respectivos valores do IE das cepas de actinobactérias isoladas.

Tabela 11 - Índice enzimático (IE) de celulase de cepas de actinobactérias isoladas de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará. Os resultados correspondem à média de oito repetições.

Cepas de actinobactérias	Diâmetro da colônia (mm)	Diâmetro do halo (mm)	Índice enzimático
TUB 2	6,25	-	-
TUB 3	5,68	-	-
TUB 4	5,08	9,89	1,95 ± 0,39
TUB 5	6,01	-	-
TUB 6	6,16	-	-
TUB 7	4,86	29,06	5,98 ± 1,23
TUB 8	3,19	16,99	5,32 ± 3,32
TUB 9	7,35	20,73	2,82 ± 0,19
TUB 11	7,72	15,96	2,07 ± 0,61
TUB 12	6,04	9,00	1,49 ± 0,18

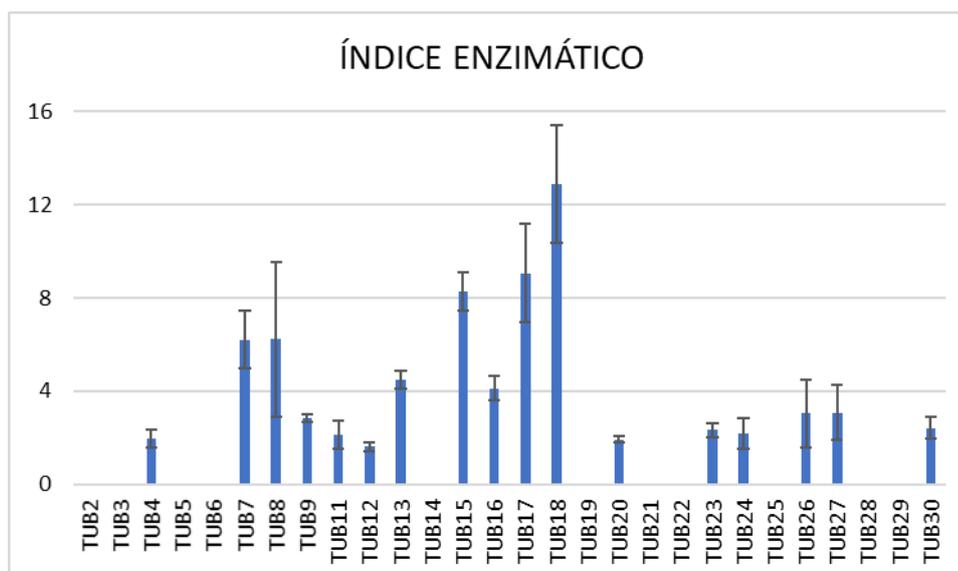
TUB 13	5,03	22,38	4,45 ± 0,38
TUB 14	5,02	-	-
TUB 15	3,80	31,04	8,18 ± 0,82
TUB 16	4,96	20,06	4,04 ± 0,50
TUB 17	4,01	34,53	8,60 ± 2,11
TUB 18	2,34	28,77	12,32 ± 2,54
TUB 19	9,43	-	-
TUB 20	6,51	12,51	1,92 ± 0,15
TUB 21	6,67	-	-
TUB 22	7,00	-	-
TUB 23	6,46	15,00	2,32 ± 0,31
TUB 24	6,40	13,23	2,07 ± 0,65
TUB 25	6,36	-	-
TUB 26	5,38	15,82	2,94 ± 1,45
TUB 27	5,55	17,10	3,08 ± 1,18
TUB 28	5,04	-	-
TUB 29	3,25	-	-
TUB 30	8,33	19,38	2,33 ± 0,48

(-) ausência de halo de hidrólise

Fonte: elaborado pelo autor.

O índice enzimático das 17 cepas de actinobactérias celulase positiva apresentou significativas variações ( $p < 0,05$ ). A cepa TUB 18 destacou-se com o maior IE, correspondendo a 12,32, enquanto a cepa TUB 12, apresentou o menor valor de IE, 1,49 (Gráfico 5).

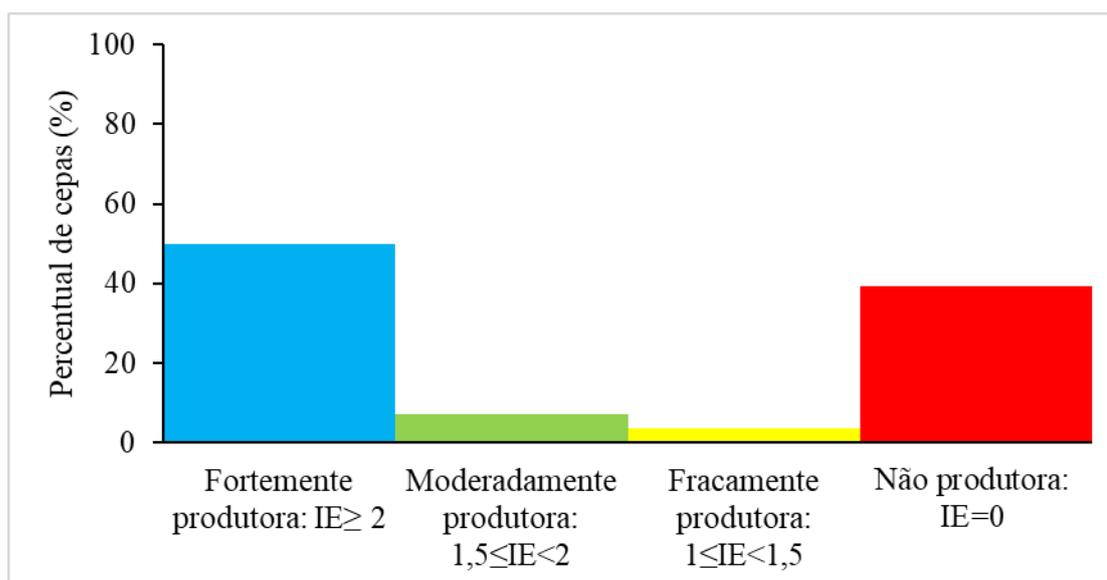
Gráfico 5 - Índice celulolítico de actinobactérias de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará.



Fonte: elaborado pelo autor.

Silva *et al.* (2015) propuseram a seguinte escala para categorização de cepas de actinobactérias conforme a produção de celulase, cepas fortemente produtoras de celulase  $IE \geq 2$ , cepas moderadamente produtoras de celulase  $1,5 \leq IE < 2$ , cepas fracamente produtoras  $1 < IE < 1,5$  e ausência de halo de hidrólise (não produtoras). Os resultados indicam a predominância de cepas fortemente produtoras de celulase, 50% (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Categorização das cepas de actinobactérias provenientes de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará, quanto ao índice celulolítico.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os elevados valores de índice enzimático da cepa TUB 18, 6,03 para IE amilolítico e 12,32 para IE celulolítico, podem estar relacionados com o fato dessa cepa ter sido isolada da área A92 que se destacou na soma dos cátions cálcio e magnésio (3,9 cmol<sub>c</sub>/kg). Não foi possível estabelecer uma relação entre os IE, amilolítico e celulolítico, e a textura do solo, já que as cepas com os valores máximos e mínimos foram isoladas de solo arenoso. Curiosamente o valor mínimo foi registrado em uma cepa (TUB 12) proveniente do solo da área A95 que possui o menor teor de matéria orgânica (22,03 g/kg) e o maior pH (6,0).

#### 5.4.3 Atividade xilanolítica

Observa-se que os diâmetros das zonas de hidrólise entre as cepas de actinobactérias variaram de 12,00 mm (TUB 25) e 45,40 mm (TUB 30) (Tabela 12). Nas cepas de actinobactérias TUB 3, TUB 6, TUB 14, TUB 22 e TUB 28 (cerca de 18%), não foi observada a formação de halo enzimático de degradação, indicando que estas não produzem xilanase. A

zona mais clara ao redor das colônias, correspondente ao halo indicador da degradação da xilana (Figura 9), foi observada em 23 cepas.

Figura 9 - Halo de hidrólise de xilana na cepa TUB 24 isolada da área de agricultura A61, Ubajara, Ceará.



Fonte: elaborado pelo autor.

A atividade xilanolítica é um fator essencial na decomposição de restos culturais já que a xilana é um polissacarídeo abundante na parede celular vegetal (MOHAMED *et al.*, 2017)

Tabela 12 - Índice enzimático (IE) de xilanase de cepas de actinobactérias isoladas de áreas de agricultura do PNU, no Ceará. Os resultados correspondem à média de oito repetições.

Cepas de actinobactérias	Diâmetro da colônia (mm)	Diâmetro do halo (mm)	Índice enzimático
TUB 2	8,17	23,66	2,89 ± 0,73
TUB 3	7,83	-	-
TUB 4	6,28	19,09	3,04 ± 0,30
TUB 5	8,06	39,86	4,95 ± 1,17
TUB 6	8,08	-	-
TUB 7	4,96	44,13	8,89 ± 1,79
TUB 8	4,31	36,84	8,56 ± 1,38
TUB 9	10,55	43,85	4,16 ± 0,28
TUB 11	9,55	28,13	2,94 ± 0,31
TUB 12	6,99	35,38	5,06 ± 0,28
TUB 13	6,91	44,84	6,49 ± 1,24
TUB 14	20,76	-	-
TUB 15	6,95	45,10	6,49 ± 0,53

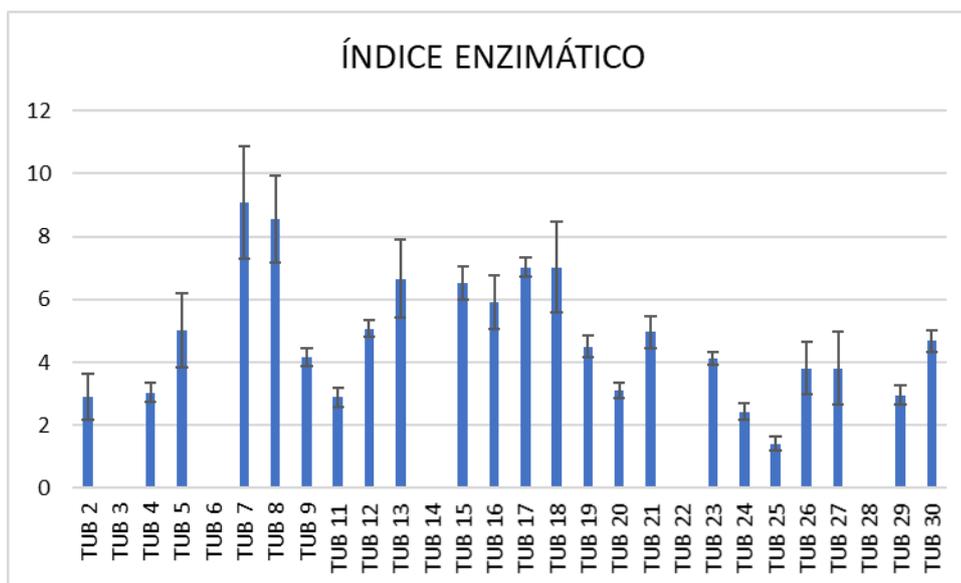
TUB 16	7,23	42,19	5,84 ± 0,86
TUB 17	6,44	45,09	7,00 ± 0,30
TUB 18	3,73	25,22	6,77 ± 1,44
TUB 19	10,04	45,26	4,51 ± 0,34
TUB 20	10,18	31,49	3,09 ± 0,25
TUB 21	8,19	40,55	4,95 ± 0,51
TUB 22	8,53	-	-
TUB 23	9,07	37,40	4,12 ± 0,21
TUB 24	10,80	26,01	2,41 ± 0,26
TUB 25	8,66	12,00	1,39 ± 0,23
TUB 26	9,08	33,49	3,69 ± 0,83
TUB 27	7,97	28,64	3,59 ± 1,16
TUB 28	7,10	-	-
TUB 29	6,58	19,45	2,96 ± 0,30
TUB 30	9,72	45,40	4,67 ± 0,35

(-) ausência de halo de hidrólise

Fonte: elaborado pelo autor.

O índice enzimático das 23 cepas de actinobactérias xilanase positiva apresentou significativas variações ( $p < 0,05$ ). As cepas TUB 7 e TUB 8 que não diferiram estatisticamente entre si destacaram-se com os maiores índices, 8,89 e 8,56, respectivamente, enquanto a cepa TUB 25 apresentou o menor valor de IE, 1,39 (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Índice xilanolítico de actinobactérias de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará.



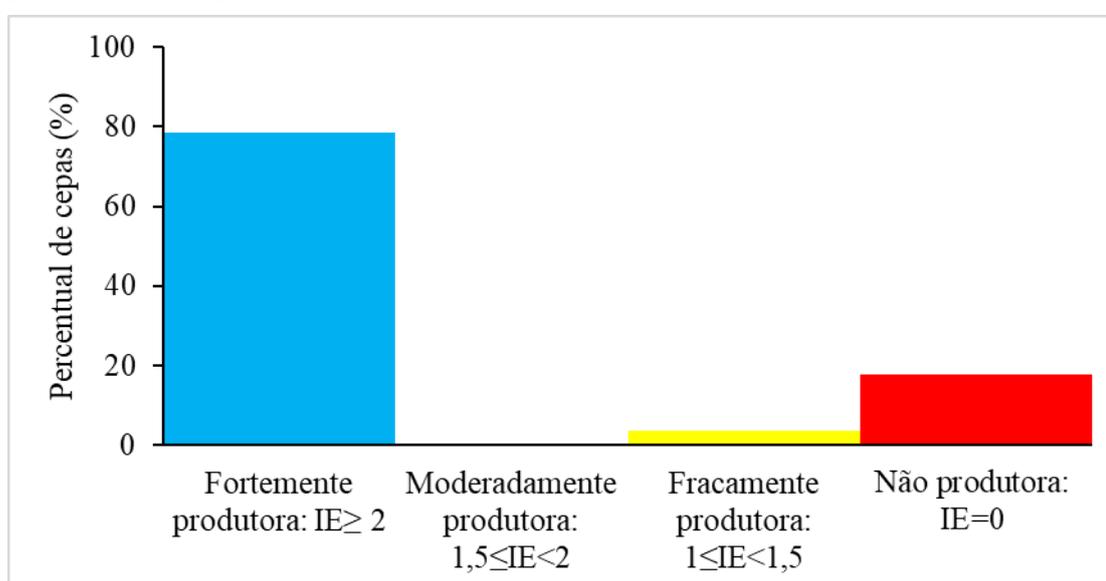
Fonte: elaborado pelo autor.

Sousa *et al.* (2018) estudando 38 cepas de actinobactérias provenientes de Quixadá (CE) obtiveram o valor máximo de índice xilanolítico de 3,02, enquanto que os maiores IE

encontrados nesse trabalho foram 8,89 e 8,56, valores bem superiores, o que reforça a importância de estudos como este.

A fim de categorizar as cepas de actinobactérias conforme a produção de xilanase utilizou-se a escala proposta por Silva *et al.* (2015) onde  $IE \geq 2$  para cepas fortemente produtoras de celulase,  $1,5 \leq IE < 2$  para cepas moderadamente produtoras de celulase,  $1 < IE < 1,5$  para cepas fracamente produtoras e  $IE = 0$  para as não produtoras (ausência de halo de hidrólise). Os resultados indicam a predominância de cepas fortemente produtoras de xilanase, 78,57% (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Categorização das cepas de actinobactérias provenientes de áreas de agricultura de Ubajara, no Ceará, quanto ao índice xilanolítico.



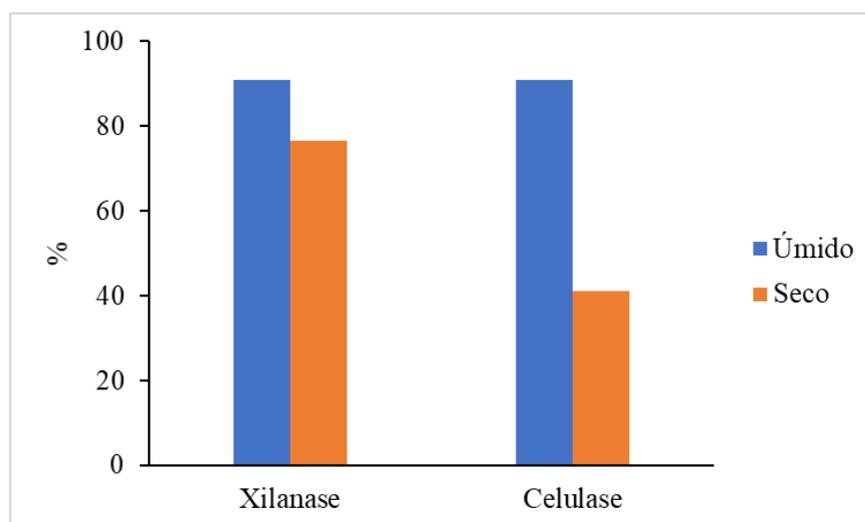
Fonte: elaborado pelo autor.

Florencio, Couri e Farinas (2012) propuseram que se o IE fosse maior que 1,5 indicaria um alto potencial de produção extracelular de enzimas, nesse caso das 23 cepas xilanase positiva apenas uma (TUB 25) não se enquadra na classificação.

O gráfico 9, mostra a diferença de produção de celulase e xilanase entre as cepas isoladas no microclima úmido e as isoladas no microclima seco, a área de microclima úmido apresentou um maior número de produtoras tanto de celulase quanto de xilanase, nos dois casos 10 das 11 cepas isoladas nesse microclima (90,91%) apresentaram halo de hidrólise, apenas a cepa TUB 14 não apresentou produção de nenhuma das duas enzimas. Não houve diferença para o índice amilolítico já que todas as cepas demonstraram produção da enzima.

Gráfico 9 - Categorização das cepas de actinobactérias em produtoras de celulase e xilanase

de acordo com o microclima.



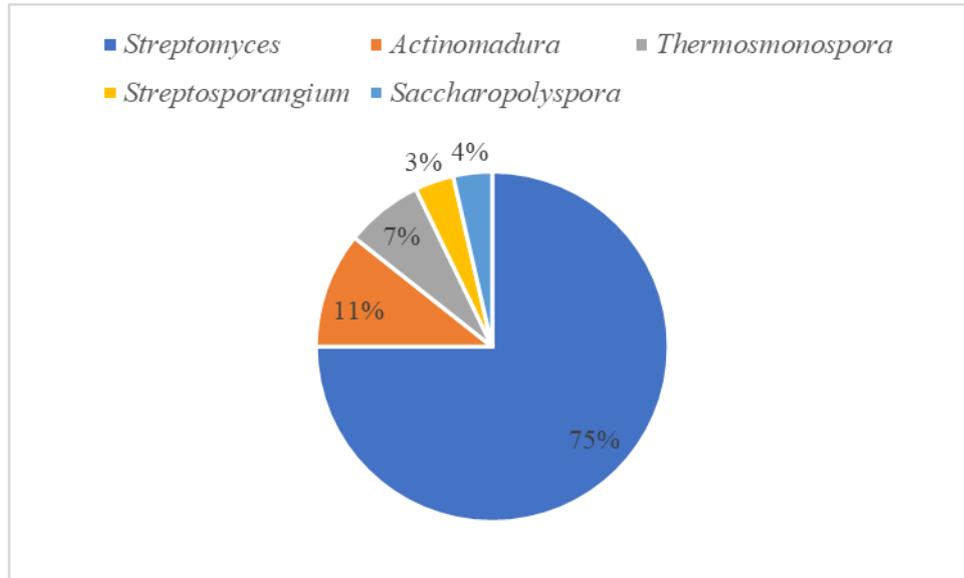
Fonte: elaborado pelo autor.

As diferenças na produção de xilanase e celulase entre os dois microclimas podem ser explicadas pelas modificações nas características do solo das duas áreas, Zhao *et al.* (2011) e Manzoni *et al.* (2014) relataram que o desenvolvimento e a proliferação das actinobactérias são influenciados por fatores ambientais como temperatura, pH e umidade do solo.

## 5.6 Microcultivo

A combinação da coloração da cepa e de suas características microscópicas, como a observação da cadeia de esporos, foram consideradas para caracteriza-las dentro de um mesmo gênero, foram identificados cinco gêneros diferentes (Gráfico 10), 21 das cepas foram classificadas como *Streptomyces*, três cepas (TUB 11, TUB 15 e TUB 21) foram classificadas no gênero *Actinomadura*, TUB 14 e TUB 27 no gênero *Thermosmonospora*, TUB 20 no gênero *Streptosporangium* e TUB 22 no gênero *Saccharopolyspora*.

Gráfico 10 - Distribuição dos isolados conforme o gênero.

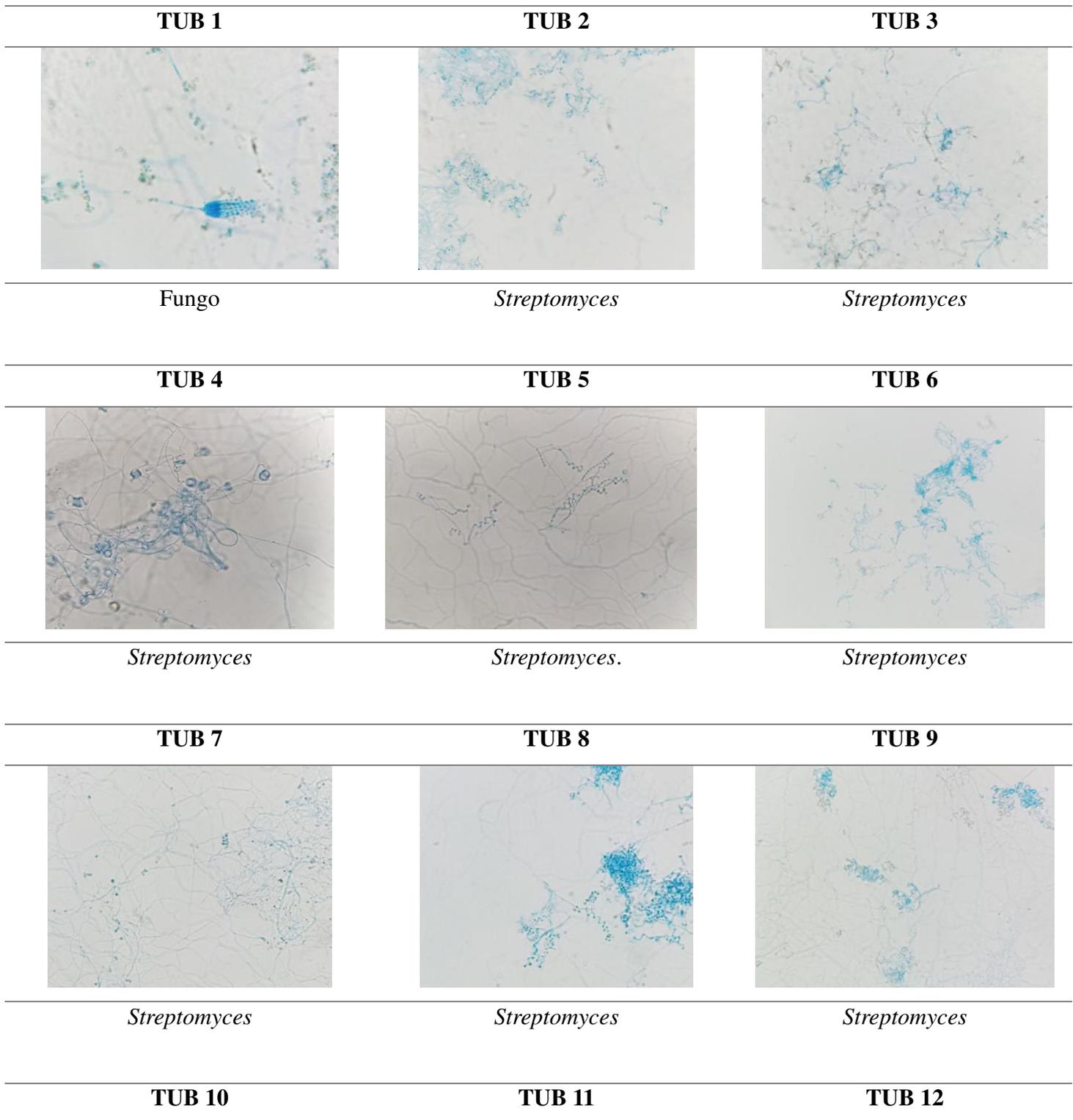


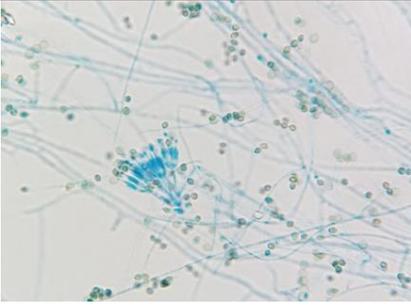
Fonte: elaborado pelo autor.

O predomínio do gênero *Streptomyces* obtido nesse estudo (75%) corrobora com Brito *et al.* (2015), que ao analisar 28 cepas também isoladas do Parque Nacional de Ubajara obtiveram 85,7% classificadas nesse gênero. Isso provavelmente ocorre pelas características inerentes a esse grupo, como pouca exigência nutricional e rápida produção e dispersão de esporos (LEWIN *et al.*, 2016, DHARMARAJ, 2010).

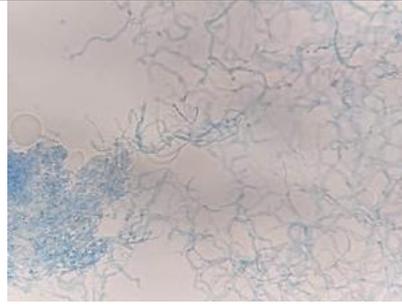
Observando as estruturas microscópicas (Figura 10) das 21 cepas de *Streptomyces*, 20 apresentaram cadeias de esporos em espiral com exceção da cepa TUB 12 que apresentou cadeias verticiladas retas. Nas cepas TUB 11, TUB 15 e TUB 21, foram observadas a presença de filamentos ondulados e cocos em cadeias espirais ou forma de gancho, características do gênero *Actinomadura*. Já nas cepas do gênero *Thermosmonospora* (TUB 14 e TUB 27) ocorreu a presença de hifas filamentosas, cocos livres e em diplococos e a presença de espirais. Observou-se a presença de esporângio contendo esporos na cepa TUB 20 e na cepa TUB 22 esporos redondos cobertos por uma bainha, características típicas dos gêneros *Streptosporangium* e *Saccharopolyspora*, respectivamente.

Figura 10 - Registro fotográfico das estruturas micromorfológicas de 2 fungos e 28 actinobactérias oriundas de áreas de agricultura de Ubajara, CE.





Fungo

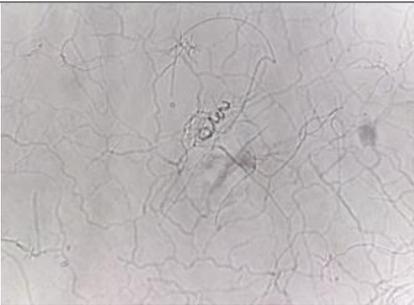


*Actinomadura*



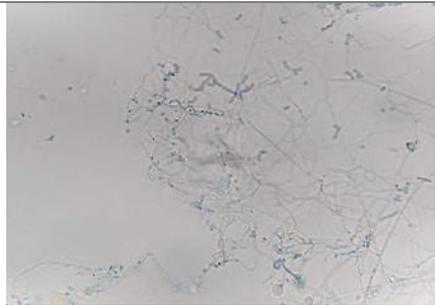
*Streptomyces*

**TUB 13**



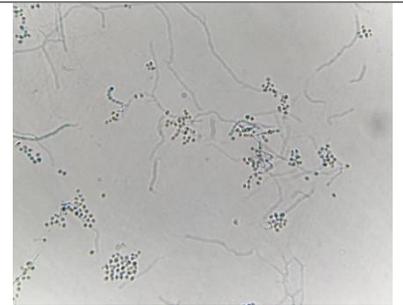
*Streptomyces*

**TUB 14**



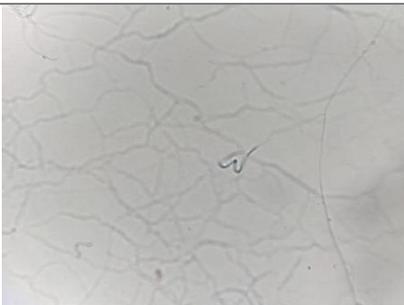
*Thermonospora*

**TUB 15**



*Actinomadura*

**TUB 16**



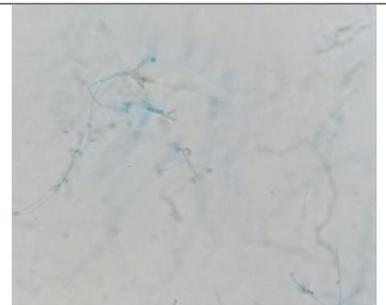
*Streptomyces*

**TUB 17**



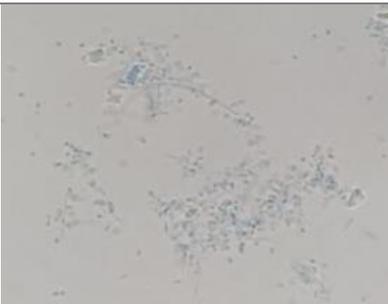
*Streptomyces*

**TUB 18**



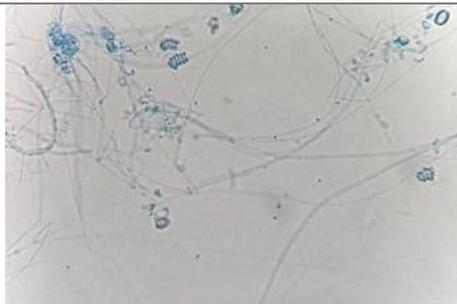
*Streptomyces*

**TUB 19**



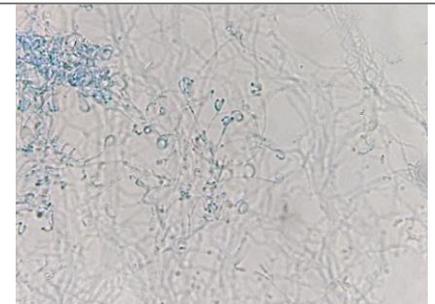
*Streptomyces*

**TUB 20**

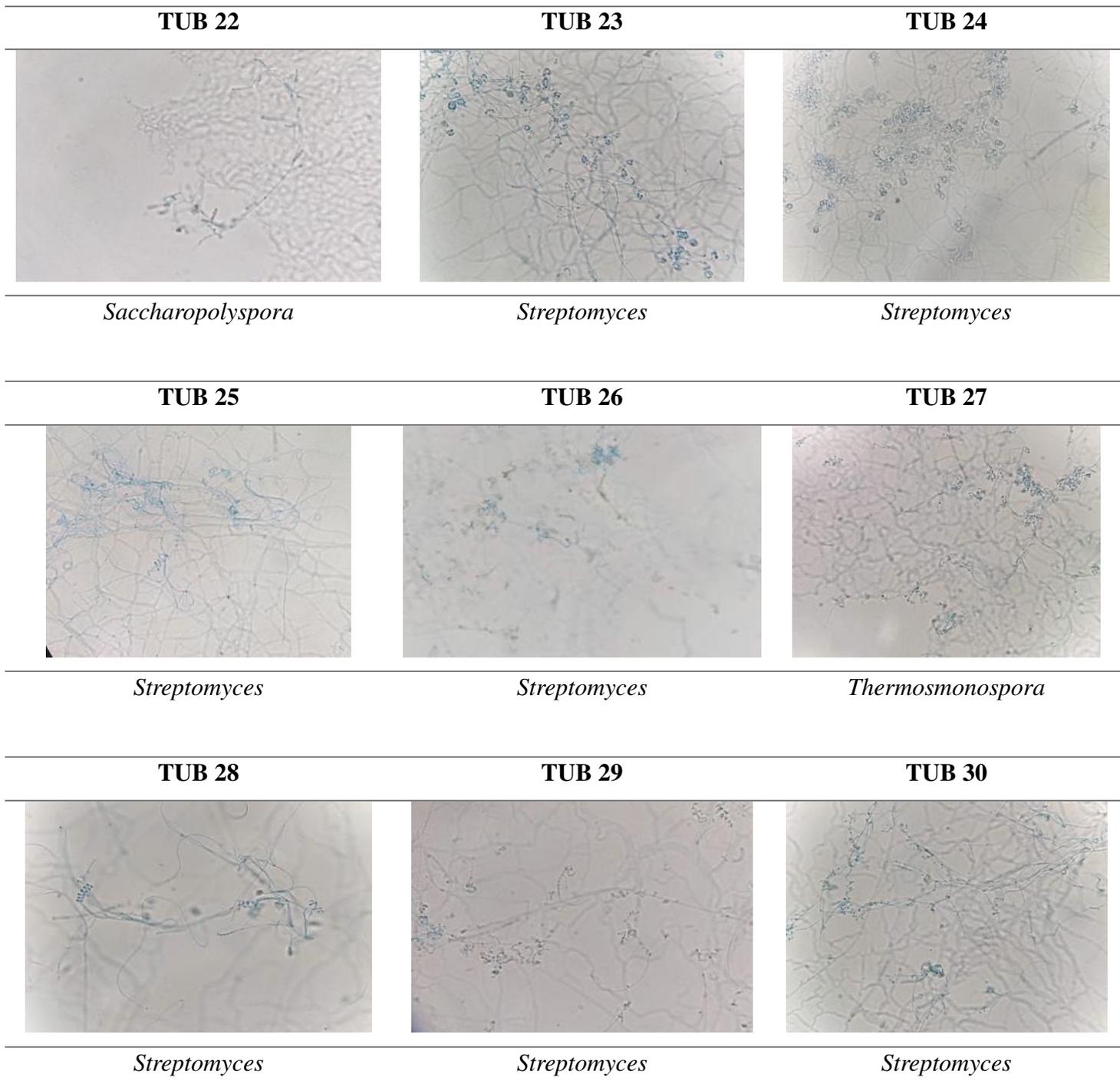


*Streptosporangium*

**TUB 21**



*Actinomadura*



Fonte: elaborado pelo autor.

Os gêneros *Streptomyces*, *Actinomadura* e *Thermosmonospora* também foram relatados em outros estudos com solo da caatinga por Brito *et al.* (2015) e Santos *et al.* (2019). A presença do gênero *Saccharopolyspora* pode ser explicada pelo fato de algumas de suas espécies, como a *Saccharopolyspora spinosa*, serem utilizadas no controle biológico de insetos no Brasil (HERTKEIN *et al.*, 2010).

## 6 CONCLUSÃO

O gênero predominante entre as 28 cepas isoladas foi o *Streptomyces* (75%), foram identificados mais quatro gêneros sendo eles *Actinomadura*, *Thermomonospora*, *Streptosporangium* e *Saccharopolyspora*.

As elevadas porcentagens de cepas com produção enzimática demonstram o grande potencial desses microrganismos e a importância de estudos como este. A caracterização morfológica e os registros de colônia e micromorfologia podem auxiliar em trabalhos futuros sobre esse tema.

## REFERÊNCIAS

- ALARIYA, S. S.; SETHI, S.; GUPTA, S.; LAL, G. B. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. **Archives of Applied Science Research**, v. 5, n. 1, p. 15-24, 2013.
- ALVES, D.; SILVA, V.; GARCIA, F.; MARTINS, S.; MARTINS, C. Produção de celulase e amilase por actinobactérias do Semiárido Brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v 13, n 24, p. 1303-1315, 2016.
- AMAL, A. M.; ABEER, K. A.; SAMIA, H. M.; ABD EL-NASSER H. N.; AHMED, K. A.; EL-HENNAWI, H. M. Selection of pigment (melanin) production in *Streptomyces* and their application in printing and dyeing of wool fabrics. **Research Journal of Chemical Sciences**. v.1, n.5, p. 22-28, 2011.
- ANDREOTE, Fernando Dini; CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira. Introdução à biologia do solo. **Microbiologia do solo**, p. 221 il, 2016.
- ANTUNES, T. C.; SALAMONI, S. P.; FRAZZON, A. P. G.; GERMANI, J. C.; SAND, S. T. V. D. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. **Revista Brasileira de Biociências**, v 11 n 2, p 131-138, 2013.
- ARAÚJO, A. S. F., BORGES, C. D.; TSAI, S. M.; CESARZ, S.; EISENHAUER, N., 2014. Soil bacterial diversity in degraded and restored lands of Northeast Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106: 891-899.
- ARIFUZZAMAN, M.; KHATUN, M. R.; RAHMAN, H., 2010. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, 9: 4615-4619.
- AUGUSTINE, D.; JACOB, J. C.; RAMYA, K.D; PHILIP, R. Actinobacteria from sediment samples of arabian sea and bay of bengal: biochemical and physiological characterization. **Inte J. Re. Mar. Sci** 2 (2): 53-63, 2013.
- AZUMA, M. V. P. **Actinobactérias com potencial biotecnológico Isoladas da região entre-marés da ilha do mel**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- BALDRIAN, P. Distribution of extracellular enzymes in soils: spatial heterogeneity and determining factors at various scales. **Soil Science Society of America Journal**, v.78, p. 11-18, 2014.
- BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C. 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**, Oxford, v.8, p.478- 486, 2012

BERG, G., EBERL, L., HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**. 7v. 1673-1685 p. 2005.

BINAYKE, A. Analysis of diversity of actinomycetes from arid and saline soils at Rajasthan, India. **Environmental Sustainability**, v. 1, n. 1, p. 61-70, 2018.

BRITO, F. A. E.; RAMOS, K. A.; SILVA, R. M. D.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. Actinobactérias do solo rizosférico no bioma. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n.21, p. 1992-2004, 2015.

BULL, A.T.; ASENJO, J.A. Microbiology of hyper-arid environments: Recent insights from the Atacama Desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 103, p. 1173–1179, 2013.

BURNS, R. G.; DEFOREST, J. L.; MARXSEN, J.; SINSABAUGH, R. L.; STROMBERGER, M. E.; WALLENSTEIN, M. D.; WEINTRAUB, M. N.; ZOPPINI, A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 58, p. 216-234, 2013.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v.93, p.1020-1025, 2002

CANTARELLA, H., PROCHNOW, L. I. (2001) Determinação de Sulfato em Solos. *In* RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais**. Campinas, Instituto Agrônômico, 285p.

CARDOSO, E. J. B. N., FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N., TSAI, S. M., NEVES, M. C. P. eds. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p. 41-57.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais**. Química Nova, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CEREDA, M.P; FRANCO, C.M.L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO L.J.C.B.; LEONEL, M.; VILPOUX, O.F.; SARMENTO, S.B.S. **Propriedades gerais do amido**. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, p 224, 2001.

CHAPTER, K. F., HOPWOOD, D. A. *Streptomyces*. In: SONENSHEIN, A.L., HOCH, J.A., LOSICK, R. *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria, 83-89 p. 1993

COUGHLAN, M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain cleaving xylanases. In: VISSER, J. (Ed). *Xylan and Xylanases*. Elsevier, Amsterdam, 1992.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Brazilian journal of microbiology**, v. 26, p. 314–317. 1995.

CROSS, T. Growth and examination of actinomycetes – Some guidelines. In: WILLIAMS, S.T., SHARPE, M.E., HOL, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Willians & Wilkins, 4 v. 2340 – 2343 p. 1989.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Exploring microbial diversity: a vast below. *Science*, New

York, v. 309, n. 5739, p. 1331-1333, Aug. 2005.

DHARMARAJ, S. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, n.12, p.2123-2139, 2010.

ELBENDARY, A. A. HESSAIN, A. M.; EL-HARIRI, M. D.; SEIDA, A. A.; MOUSSA, I. M.; MUBARAK, A. S.; KABLI, S. A.; HEMEG, H. A.; EL JAKEE, J. K. Isolation of antimicrobial producing actinobacteria from soil samples. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 44-46, 2018.

ESCUADERO, E. L. R., DAZA, O. D. S.; TORRES, J. H. Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* SP. **Rev. Colombiana de Biotecnología**. v. 14, n. 2, Dec. 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 613 p, 1989.

FERNANDES L.P.; ULHOA, C.J.; ASQUIERI,E.R.; MONTEIRO,V.N., Produção de amilases pelo fungo MACROPHOMINA PHASEOLINA, **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol. IV, p. 43-45; 2007.

FERREIRA, C. Descoberta metagenômica da dinâmica do microbioma da rizosfera de Mandacaru na Caatinga. Biblioteca Virtual ESALQ, 2014.

FERREIRA-FILHO, E. X. The Xylan-degrading enzyme system. **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, v. 27, p. 1093-1109, 1994

FILHO, J. P.; MAGALHÃES, F. S. de. 2008. Dispersão de amostras de Latossolo Vermelho eutroférrico influenciadas por pré-tratamento para oxidação da matéria orgânica e pelo tipo de agitação mecânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 32: 1429-1435, 2008.

FILIZOLA, H. F.; GOMES, M.A.F.; SOUZA, M.D. **Manual de Procedimentos de Coleta de Amostras em Áreas Agrícolas para Análise da Qualidade Ambiental: Solo, água e sedimentos**. Ed. Embrapa. Campinas-SP. p.25-27, 2006.

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**, p.1-7, 2012. Disponível em: doi: 10.1155/2012/793708

GENILLOUD, O.; GONZÁLEZ, I.; SALAZAR, O.; MARTÍN, J.; TORMO, J. R.; VICENTE, F. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.375- 389, 2011.

GEORGE, M.; AJUMOL, A.; GEORGE, G.; MOHAMED HATHA, A. A. Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from diferente ecological habitats. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 2265-2271, 2012.

GOODFELLOW M. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer; 2012.

- GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. Introduction to and importance of actinomycetes, In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. **Actinomycetes in Biotechnology**. New York: Academic Press, p. 2-5, 1998.
- GOS, F. M.W. R.; SAVI, D. C.; SHAABAN K. A., THORSON, J. S.; ALUIZIO, R.; POSSIEDE, Y. M.; ROHR, J.; GLIENKE, C. Antibacterial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from the Medicinal Plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). *Front Microbiol.* 2017 Sep 6;8:1642. doi: 10.3389/fmicb.2017.01642.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B., 2003. Microbial alpha amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 38, 1599-1616. 2003.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect cellulose activity of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, London, v. 98, n. 1, p. 109-115, 1977.
- HERTKEIN, M.B.; MAVROTAS, C.; JOUSSEAUME, C.; LYSANDROU, M.; THOMPSON, G.D.; JANY, W.; RITCHIE, S.A. A review of Spinosad as a natural product for larval mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association** 26: 67-87, 2010.
- HORNER-DEVINE, M. C.; LEIBOLD, M. A.; SMITH V. H.; BOHANNAN, B. J. M. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. **Ecology Letters**, Malden, v. 6, n. 7, p. 613-622, 2003.
- IPECE, 2017. Perfil Municipal 2017 Ubajara. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará – IPECE. Governo do Estado do Ceará. 18p. Disponível em: [https://www.ipece.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/45/2018/09/Ubajara\\_2017.pdf](https://www.ipece.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/45/2018/09/Ubajara_2017.pdf)
- IRFAN, M.; SAFDAR, A.; SYED, Q.; NADEEM, M. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. *Türk Biyokimya Dergisi / Turkish Journal of Biochemistry*. 37. 120-128, 2012.
- JAYASINGHE, B. A. T. D.; PARKINSON, D., 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. **Applied Soil Ecology**, 38: 109-118.
- JESUS, J. A., 2013. **Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Pós-graduação em Produção Vegetal, Campos dos Goytacazes-RJ.
- JIANG, X.; GENG, A.; HE, N.; LI, Q. New iso- lated of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.111, p.121- 127, 2011.
- KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, Jan. 1999.
- KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of**

**Soil and Water Conservation**, Ankeny, v. 50, n. 3, p. 243-248, 1995.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica: Texto e Atlas**. 2 ed. São Paulo: Premier, 1999.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, June 2005.

KUSTER, E. Taxonomy of soil actinomycetes and related organisms. In: Gray, T.R.G., Parkinson, D. (Eds.), **The ecology of soil bacteria**. University of Toronto Press, Toronto, Canadá, p. 322–336, 1968.

KUMAR, V., BHARTI, A., NEGI, Y. K., GUSAIN, O., PANDEY, P., et al. Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.205-214, 2012.

KUMAR, J. G. S. P.; GOMATHI, A.; VASCONCELOS, V.; GOTHANDAM, K. M. Bioactivity assessment of Indian origin-mangrove actinobacteria against *Candida albicans*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 2, p. 60, 2018a. DOI: <https://doi.org/10.3390/md16020060>

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

LAMBAIS, M.R; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.R.D.; BÜLL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: SBCS, v. 4, p. 43-84, 2005.

LAZZARINI, A.; CAVALETTI, L.; TOPPO, G.; MARINELLI, F. Gêneros raros de actinomicetos como potenciais produtores de novos antibióticos. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2000 dez;78(3-4):399-405. Corrigido e republicado em: *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2001 set;79(3-4):399-405. PMID: 11386363.

LECHEVALIER, M. P. P.; LECHEVALIER, H. A. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 20, n. 4, p. 435-443, Oct. 1970.

LEIVA, P.S., YANEZ, S. M., ZABOR, C.L., et al. Atividade Antimicrobiana de Actinomicetos Aislados desde Ambientes Acuáticos Del Sur de Chile. **Rev. méd. Chile**, v. 132, n. 2, p. 151 – 159, 2004.

LEWIN, G. R.; CARLOS, C.; CHEVRETTE, M. G.; HORN, H. A., MCDONALD, B. R.; STABKEY, R. J.; FOX, B. G.; CURRIE, C. R. Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, p. 235-254, 2016.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.69, p.627-642, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO J.M.; DUNLAP P.V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Artmed, 2004.

MAIA, G. N. **Árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z, 2004.

MANZONI, S.; SCHAEFFER, S.; KATUL, G.; PORPORATO, A.; SCHIMEL, J. A theoretical analysis of microbial eco-physiological and diffusion limitations to carbon cycling in drying soils. **Soil Biology and Biochemistry**. 73. 69 – 83. 2014.

MAYFIELD, C. I.; WILLIAMS, S. T.; RUDDICK, S. M.; HATFIELD, H.L. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 4, p. 79-91, 1972.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment: a review. *Gene, Viena*, v. 115, n. 1/2, p.189-192, June 1992.

MEDEIROS, E. J. T., CAVALCANTE, F. G., SILVA, V. M. A., SILVEIRA, S. C., MARTINS, C. M. Diversidade cultural de cepas de actinobactérias do semiárido. **Enciclopédia Biosfera**, v.15, n.27, p.205-218, 2018.

MEHRAVAR, M.; SARDARI, S.; OWLIA, P. Screening of membrane active antimicrobial metabolites produced by soil actinomycetes using membrane models. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 1, n. 4, 2010.

MELO I. S. Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas: Descrição e Potencial de Uso na Agricultura. In: MELO, I.S., de AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 87-116 p. 1998.

MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad and the ugly. *Antonie Van Leeuwenhoek, Amsterdam*, v. 98, n. 2, p. 143-150, Aug. 2010.

MOHAMED, A. H., YOUSEIF, S. H., ABD EL-MAGEED, F. H., HEIKAL, N. Z., MOUSSA, T. A., et al. Production of cellulase, exoglucanase and xylanase by different microorganisms cultivated on agricultural wastes. **Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences**, v.8, n.4, p.435-452, 2017.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NANNIPIERI, P.; ASHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Hoboken, v. 54, n. 4, p. 655-670, Dec. 2003.

OKORO, C. K.; BROWN, R.; JONES, A. L.; ANDREWS, B. A.; ASEJO, J. A.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.95, p.121-133, 2009.

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.

OLIVEIRA, R. L. **Produção e caracterização de Celulases Extracelulares produzidas por actinobactérias**. 2015. 90 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do

Amazonas, Manaus, 2015.

PARTE, A. C.; SARDA CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; REIMER, L. C.; GOKER, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70**, 5607-5612; DOI: 10.1099/ijsem.0.004332

PILON, P.; BARBE, M. C.; DESROCHERS, M; JURASEK, B; NEUMAN, P. J. Fungal treatment of mechanical pulps-it effect on paper properties. **Biotechnology Bioengineering**, **24**: 2063-2076, 1992.

POLESI, L. F.; Amido resistente: aplicações e métodos de produção. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 29, n.2, p. 211- 222, 2011.

PRAUSER, H. Aptness and application of colour codes for exact description of colours of streptomycetes. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*. v.4, p. 95-98, 1964.

PRIYADHARSINI, P.; DHANASEKAREN, D. Diversity of soil allelopathic actinobacteria in Tiruchirappalli district, Tamilnadu, India. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v.14, p. 54-60, 2015.

RAAIJMAKERS, J. M.; PAULITZ, T. C.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C.; MOENNE-LOCCOZ, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganism. **Plant and Soil**, Hague, v. 2, p. 341-361, 2009.

REDDY, G. S. N.; PRADHAN, S.; MANORAMA, R.; SHIVAJI, S. *Cryobacterium roopkundense* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from glacial soil *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 866-870, 2010.

ROMERO, F., FERNÁNDEZ-CHIMENO, R. I., DE LA FUENTE, J. L., BARREDO, J.-L. Selection and Taxonomic Identification of Carotenoid–Producing Marine Actinomycetes. *Methods in Molecular Biology*, 13–20. 2012.

SAKURE, S.; LIMBORE, A.; ZALAKE, M.; JAIGUDE, S. Isolation and characterization of Actinomycetes from rhizosphere soil of different plants for antiphytopathogenic activity and stress tolerance. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.2, p. 379-387, 2015.

SALAM, N.; JIAO, J. Y.; ZHANG, X. T.; LI, W. J. Update on the classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1331-1355, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003920>

SAMER; Al-Hulu. Effects of Some Conditions on Antibacterial Activity of Actinomycetes Spp. Isolated from Soil Samples. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 9, n.1, p. 86-90, 2015

SANTOS, F. D.; OLIVEIRA, M. P.; MENESES, A. C. M. A.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Morfologia de cepas de actinobacterias em áreas suscetíveis à desertificação. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 19, p. 1911-1924, 2019.

SCIPIONI, G. C. **Otimização do processo de sacarificação do amido de Batata (*Solanum tuberosum* L.) utilizando enzimas amilolíticas**; Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processo, RS, 2011.

SHARMA, M. Actinomycetes: Source, identification, and their applications. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**. v.3, n.2, p. 801- 832, 2014.

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

SHOUCHE, S; BHATI, P. Potencial of actinomycetes as bioremediating and biocontrolling agents. Paripex - **Indian Journal of Research**, v.8, p.36-40, (2019).

SILVA, M. E.; SALES, A. N.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; DIAS, D. R.; SCHAWN, R. F., 2012. Brazilian Cerrado Soil Actinobacteria Ecology. **BioMed Research International**, 2013.

SILVA, G. L. **Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma Caatinga**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Recife, 2013.

SILVA, V. M. A.; BRITO, F. A. E.; RAMOS, K. A.; SILVA, R. M.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade enzimática de actinobactérias do semiárido. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 560-572, 2015.

SILVA, M. J. S.; SOUSA, J.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Diversidade de cepas de actinobactérias da RPPN “Fazenda Não me Deixes” - Quixadá (CE). **Enciclopédia Biosfera**, v.16, n.29, p.1857-1869, 2019.

SOUSA, J. B., LIRA, I. C., MARTINS, S. C. S., MARTINS, C. M. Efeito da antropização sobre a produção da enzima xilanase em actinobactérias. **Enciclopédia Biosfera**, v.15, n.28, p.1033-1042, 2018.

TAO, Y.M.; ZHU, X.Z.; HUANG, J.Z.; MA, S.J.; WU, X.B.; LONG, M.N.; CHEN, Q.X. Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.6126-6130, 2010.

TEIXEIRA, P.C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. (Ed.) (2017). **Manual de Métodos de Análise de Solo**. 3. ed. Distrito Federal. Embrapa, 573 p.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; BARDGETT, R. D.; VAN STRAALLEN, N. M. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, Malden, v. 11, n. 3, p. 296-310, 2008.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 3, p. 495-548, Mar. 2007.

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

ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; GUAN, T.; XIAO, J.; CHEN, Q.; XU, J.; LINDSTROM, K.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; STROBEL, G. A. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in **Panxi Plateau China Current microbiology**, v. 62, n. 1, p. 182-190, 2011.