

INSTITUTO BIOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO

**Investigação do potencial biotecnológico e avaliação da
atividade antimicrobiana de linhagens de *Streptomyces* spp.
fitopatogênicas**

ALEX AUGUSTO TOMASETO

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Profa Dra Suzete A. L.

Destéfano

São Paulo

2016

Alex Augusto Tomaseto

Investigação do potencial biotecnológico e avaliação da atividade antimicrobiana de linhagens de *Streptomyces* spp. fitopatogênicas

Orientador(a): Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Dr.(a): Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Alessandra Figueiredo de Castro Nassar

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Alysson Wagner Fernandes Duarte

Instituição: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM

Dedico à minha família por fazer parte
de mais essa etapa da minha vida.
Pela paciência e amor em todo esse
percurso! Pelo exemplo de vida,
esforço e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma doaram um pouco de si para que a realização e finalização deste trabalho fossem possíveis.

A minha orientadora Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, que desde a graduação esteve ao meu lado, me incentivando e me ensinando. Este projeto e hoje a conclusão do mesmo, partindo do zero, como falaram “um tiro no escuro” fosse possível! Hoje o que sou como profissional e acadêmico é fruto de todo seu amor, carinho, paciência, desespero, insistência e dedicação. Obrigado por tudo, todos esses anos.

À Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini por todo o auxílio como “co-orientadora” do projeto e realização dos experimentos nas dependências do CPQBA – UNICAMP.

Ao Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte por toda paciência, tempo doado, amizade e principalmente ao auxílio e ensinamentos nos experimentos realizados no CPQBA-UNICAMP.

À Profa. Dra. Alessandra Figueiredo Castro Nassar por todo o auxílio, colaboração, paciência, ensinamentos e amizade na realização dos experimentos realizados no Laboratório de Bacteriologia Geral/IB/SP.

Ao Dr. Márcio José da Silva, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP, pelo sequenciamento das amostras de DNA.

Aos amigos de Pós-Graduação que de alguma forma contribuíram nesses anos de Mestrado. Especialmente para Carol Belei, minha companheira de casa, amiga e confidente; para Bia, parceira de viagem, risadas, amiga desde a faculdade; Allan, Isa e Fernando por toda a parceria e companhia nas aulas e fora delas.

Aos meus companheiros de laboratório, Prof. Dr. Beriam, Msc. Irene, contribuição e ensinamentos. Para Soninha (saudades), Alan, Felipe e Júlia pelo auxílio, amizade e companheirismo. Foi sensacional trabalhar com vocês.

À Dani, “Dra. Dani” obrigado por tudo, todos os ensinamentos, toda a paciência, todo o carinho, principalmente nessa etapa final.

Marilda, Karen, Bah e Marcel, sem vocês essa dissertação não seria possível. Obrigado pela colaboração com os experimentos, com toda a dedicação, amizade, companheirismo, amor, felicidade e MUITAS risadas! Meus dias de laboratório só são completos e realmente eficientes quando vocês estão lá! Vocês todos, viu Dani? Hahaha! Amo vocês!

Aos meus amigos, por estarem sempre ao meu lado, família que a gente escolhe.

À pessoa, que apareceu no final e na pior fase dessa dissertação, Léo, obrigado por suportar diariamente minhas reclamações, por me acalmar a cada experimento falho, por estar do meu lado a cada recomeço, por que pesquisa é assim, nunca sabemos o que acontecerá. Hoje, sou realmente feliz e realizado graças a você e toda a sua dedicação, amor, amizade, companheirismo, felicidade, risadas, carinho, você ser você, vida. Sempre ao seu lado! Obrigado por tudo.

Agradeço a Pós Graduação do Biológico/SP pela possibilidade de participar do programa e a CAPES pelo suporte financeiro do projeto e concessão da bolsa de Mestrado.

“When the pain cuts you deep
When the night keeps you from sleeping
Just look and you will see
That I will be your remedy”

TOMASETO, A. A. INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LINHAGENS DE *STREPTOMYCES* SPP. FITOPATOGÊNICAS. São Paulo. 2016. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) – Instituto Biológico

RESUMO

As bactérias pertencentes ao filo Actinobacteria são consideradas ótimos degradadores de matéria orgânica como celulose, pectina e amido, produzem compostos químicos como vitaminas, compostos naturais potencialmente valiosos, como policetídeos (PKS), peptídeos não ribossomais (NRPS), alcalóides e uma ampla variedade de antibióticos, toxinas e antitumorais. Dentro desse filo, destacam-se as bactérias do gênero *Streptomyces*, as quais apresentam alta capacidade de produzir uma vasta variedade de metabólitos biologicamente ativos. O trabalho teve por objetivo investigar a presença de genes que codificam enzimas funcionais do sistema PKS-I, PKS-II e NRPS, por meio do emprego de *primers* específicos; avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de 65 linhagens fitopatogênicas de *Streptomyces* spp. frente a bactérias de importância clínica como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (isolado de porco), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Escherichia coli* (ATCC 11775) por meio da técnica de dupla camada. Ainda, o estudo visou avaliar o potencial biotecnológico de 64 linhagens de *Streptomyces* spp. quanto à produção de enzimas extracelulares como amilase, protease e pectinase. Os resultados mostraram que todas as linhagens fitopatogênicas apresentaram sinal positivo de amplificação para o gene PKS-II, relacionado à produção de compostos fenólicos aromáticos, enquanto que para os genes PKS-I e NRPS, associados à produção de antibióticos, a presença foi variável. Nos experimentos de atividade antimicrobiana foram obtidos resultados promissores, com linhagens de *Streptomyces* spp. capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* (20 linhagens), *B. cereus* (14), *E. coli* (3) e *P. aeruginosa* (13). Somente duas linhagens de *Streptomyces* sp., IBSBF 2019 e IBSBF 2397, foram capazes de inibir o crescimento das quatro bactérias clínicas testadas. Nos ensaios de produção de enzimas extracelulares, 91% (59/65) das linhagens de *Streptomyces* spp. apresentaram halos de degradação para o amido, sendo 40 delas com índice enzimático (IE) $\geq 2,0$; 97% (63/65) exibiram halos de degradação para pectina, com 35 linhagens apresentando IE $\geq 3,0$; e nos testes de degradação de leite, 73% (48/65) das linhagens apresentaram halos de degradação com IE $\geq 2,5$.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; produção amilase, protease e pectinase; genes PKS-I, PKS-II e NRPS;

TOMASETO, A. A. INVESTIGATION OF BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANT PATOGENIC STRAINS OF *STREPTOMYCES* SPP. Sao Paulo. 2016. Dissertation (Master in Food Safety and Health at Agroecosystem) - Biological Institute

ABSTRACT

Bacteria belonging to the Actinobacteria phylum are considered good organisms in the decomposition of organic matter such as cellulose, pectin and starch. They can produce chemical compounds like vitamins and potentially valuable natural compounds such as polyketide (PKS), non-ribosomal peptide (NRPS), alkaloids and a wide range of antibiotics, toxins and antitumor substances. Within this phylum, there are species belonging to *Streptomyces* genus, which have a high ability to produce biologically active metabolites. This study aimed to investigate the presence of genes that encode functional enzymes of PKS-I, PKS-II and NRPS system, through specific primers; to evaluate the antimicrobial activity of plant pathogenic strains of *Streptomyces* spp *in vitro* against clinical importance bacteria such as *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (isolated from pork), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) and *Escherichia coli* (ATCC 11775) using the dual layer technique. The study evaluated the biotechnological potential of 64 *Streptomyces* spp. strains regarding to extracellular enzymes production such as amylase, protease and pectinase. The results showed that all the plant pathogenic strains tested presented a positive signal of amplification for PKS-II gene, related to the production of aromatic phenolic compounds, while for PKS-I and NRPS genes, associated to antibiotic production, the presence of them was variable. In the antimicrobial activity assays, the results were promising. The *Streptomyces* spp. strains were able to inhibit the growth of *S. aureus* (20 strains), *B. cereus* (14), *E. coli* (3) and *P. aeruginosa* (13). Only two strains of *Streptomyces* sp., IBSBF 2019 and IBSBF 2397, were able to inhibit the growth of the four clinical bacteria tested. In the extracellular enzymes production assays, 91% (59/65) of *Streptomyces* strains showed degradation halos on agar plates supplemented with starch, 40 with enzymatic index (EI) $\geq 2,0$; 97% of them (63/65) exhibited degradation halos to pectin, with 35 strains showing EI $\geq 3,0$; and in the degradation tests of skim milk, 73% (48/65) of the strains presented EI $\geq 2,5$.

Key-words: antimicrobial activity; production of amylase, pectinase and proteases; PKS-I, PKS-II and NRPS genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesões nos tubérculos de batata causadas por <i>Streptomyces</i> sp. (Fonte: Corrêa, 2011)	12
Figura 2. Ciclo da sarna da batata (Fonte: Agrios, 1997)	13
Figura 3. Amplificação de sequências conservadas do sistema NRPS utilizando-se de par de <i>primers</i> A3/A7R.	22
Figura 4. Amplificação do gene PKS-II utilizando-se o par de <i>primers</i> IIPF6/IIPR6.	23
Figura 5. Amplificação do gene PKS-I utilizando-se o par de <i>primers</i> KI/M6R.....	24
Figura 6. (A) Halo de inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> por <i>Streptomyces caviscabies</i> (IBSBF 2260). (B) Halo de inibição do crescimento de <i>Bacillus cereus</i> por <i>Streptomyces scabiei</i> (IBSBF 2292).	27
Figura 7. (A) Halo de inibição do crescimento de <i>Escherichia coli</i> por <i>Streptomyces</i> sp. (IBSBF 2019). (B) Halo de inibição do crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por <i>Streptomyces</i> sp (IBSBF 2247).	27
Figura 8. Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene PKS-II.....	33
Figura 9. Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene NRPS	33
Figura 10. Hidrólise de amido. (A) <i>Streptomyces</i> sp. IBSBF 2343; (B) <i>S. caviscabies</i> IBSBF 2236.....	35
Figura 11. Hidrólise e ausência de hidrólise de amido. (A) <i>S. europaeiscabiei</i> IBSBF 1943; (B) <i>Streptomyces</i> sp. IBSBF 2395	36
Figura 12. Hidrólise de pectina. (A) <i>Streptomyces caviscabies</i> IBSBF 2236; (B) <i>Streptomyces</i> sp. BSBF 2397.....	36
Figura 13. Hidrólise e ausência de hidrólise de pectina realizada por linhagens de <i>S. europaeiscabiei</i> (A) IBSBF 2510; (B) IBSBF 2472.....	36
Figura 14. Hidrólise de leite realizadas por linhagens de <i>Streptomyces</i> sp. (A) IBSBF 2431; (B) IBSBF 2397.....	37
Figura 15. Hidrólise e ausência de hidrólise de leite. (A) <i>S. caviscabies</i> IBSBF 2021; (B) <i>S. scabiei</i> IBSBF 2257.....	37
Figura 16. Índice Enzimático de amilase, pectinase e protease obtido de linhagens de <i>S. scabiei</i>	38
Figura 17. Índice Enzimático de amilase, pectinase e protease das linhagens de <i>Streptomyces europaeiscabiei</i> , <i>S. caviscabies</i> e <i>S. sampsonii</i>	39
Figura 18. Índice Enzimático de amilase, pectinase e protease das linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Linhagens de <i>Streptomyces</i> sp. utilizadas nesse estudo.....	15
TABELA 2. Avaliação da presença dos genes NRPS e PKS-I e II nas linhagens de <i>Streptomyces</i> spp. avaliadas nesse estudo.....	25
TABELA 3. Avaliação da atividade antimicrobiana das linhagens de <i>Streptomyces</i> spp. frente às bactérias de importância clínica.	28
TABELA 4. Medida do tamanho das colônias medido perpendicularmente e diâmetro do halo de degradação para detecção da atividade enzimática das linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.	62
TABELA 5. Índice Enzimático das linhagens de <i>Streptomyces</i> spp. referente a produção de diferentes enzimas extracelulares.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	sulfato de amônio
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BA	Bahia
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	sulfato cúprico penta-hidratado
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	sulfato de ferro II heptahidratado
g	gramas
G+C	guanina e citosina
GO	Goiás
h	hora
HCl	Ácido Clorídrico
IBSBF	Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico
IE	Índice Enzimático
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	fosfato dipotássio hidratado
KH_2PO_4	fosfato de potássio monobásico
LBG	Laboratório de Bacteriologia Geral
M	molar
mg	miligrama

MG	Minas Gerais
MgSO ₄ .7H ₂ O	sulfato de magnésio hidratado
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MnCl ₂ .4H ₂ O	dicloro manganês tetrahidratado
NRPS	<i>non-ribosomal peptide synthetase</i>
p/v	peso/volume
pb	pares de bases
pH	potencial hidrogeniônico
PKS	<i>polyketide synthases</i>
PMGL	pectina liase
PR	Paraná
qsp	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SP	São Paulo
sp.	Espécie
spp.	Espécies
STS	Solução com traços de sais
U	unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
YME	<i>Yeast Malt Extract</i>
ZnSO ₄ .7H ₂ O	sulfato de zinco heptahidratado

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
SUMÁRIO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. Revisão de Literatura.....	2
2.1. Actinomicetos.....	2
2.2. Potencial Biotecnológico das actinobactérias.....	4
2.3. Mercado Enzimático.....	7
2.3.1. Amilases	8
2.3.2 Pectinases.....	9
2.3.3. Proteases.....	10
2.4. Gênero <i>Streptomyces</i> , sarna da batata e ciclo da doença	11
2.4.1 <i>Streptomyces</i> spp. fitopatogênicas	11
3. OBJETIVOS	14
3.1. OBJETIVO GERAL	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Linhagens de <i>Streptomyces</i> e condições de cultivo	15
4.2 Extração de DNA.....	16
4.3. Bioprospecção genética do potencial biotecnológico das bactérias	17
4.4. Sequenciamento e análise filogenética dos genes PKS-II e NRPS.....	18
4.5. Determinação da atividade antimicrobiana de linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.	19
4.6. Determinação da atividade enzimática de linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.	20

4.6.1. Produção de enzimas extracelulares.....	20
4.6.1.1. Produção de amilase	20
4.6.1.2. Produção de protease	20
4.6.1.3. Produção de pectinase.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. Bioprospecção genética do potencial biotecnológico das bactérias	21
5.1.1. Determinação da Atividade Antimicrobiana frente a bactérias de importância clínica	26
5.1.2. Sequenciamento e análise filogenética dos genes PKS-II e NRPS	32
5.2. Produção de enzimas extracelulares.....	35
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO 1	61
APÊNDICE 1	62
APÊNDICE 2	64

1. INTRODUÇÃO

O filo Actinobacteria compreende um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas, que em seu crescimento, formam redes de filamentos ramificados, dentro desses grupos destacam-se as bactérias do gênero *Corynebacterium*, *Streptomyces* e *Frankia* (ENSIGN, 1978; VENTURA et al., 2007).

Os actinomicetos são organismos que atuam diretamente na degradação de compostos orgânicos e as enzimas produzidas por essas bactérias estão sendo bastante utilizadas em diversas indústrias, sendo empregados na produção de compostos comerciais ou para transformação de substratos em produtos de maior valor agregado, como por exemplo, etanol, acetona, plásticos biodegradáveis (KURTBÖKE et al., 2004).

Esses micro-organismos encontrados no solo são comumente selecionados por metabólitos secundários, são os maiores reservatórios de compostos naturais potencialmente valiosos, tais como policetídeos, PKS, (do inglês *polyketide synthases*), peptídeos não ribossomais, NRPS, (do inglês *non-ribosomal peptide synthetase*). (ZHAO et al., 2008; GINOLHAC et al., 2004). A síntese de PKSs e NRPSs resulta numa ampla diversidade de compostos biologicamente ativos, incluindo antibióticos, toxinas, sideróforos, e imunossupressores (CROSA; WALSH, 2002, KLEINKAUF, VON DÖHREN, 1990).

A bioprospecção de novos compostos bioativos naturais tem como foco a detecção de novos PKSs e NRPSs, os quais são sintetizados por bactérias, fungos e plantas (MOFFITT; NEILAN, 2003)

Nesse sentido, os actinomicetos estão emergindo como importante fonte de enzimas envolvidas na degradação de inúmeros compostos e entre estes micro-organismos as que mais se destacam no filo Actinobacteria são as bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* (FLORES et al., 1997; GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005).

Na indústria de alimentos, são empregados na produção de bebidas, panificação, queijos, entre outros. Já na área médica, são amplamente utilizados na produção de antimicrobianos, antitumorais e substâncias antiparasitárias. São muito empregadas no controle biológico (KURTBÖKE et al., 2004)., atuando na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos, dessa forma, podendo ser empregados como uma alternativa ao uso de pesticidas (SILEVANGESLITA-MARTINEZ, 2014), são também antagonistas de bactérias fitopatogênicas do gênero *Streptomyces* (COMPARONI, 2015; WANNER; KIRK; QU, 2013).

As bactérias do gênero *Streptomyces* são consideradas fonte de compostos bioativos, pois apresentam alta capacidade de produzir e excretar uma vasta variedade de metabólitos biologicamente ativos, como substâncias antibióticas, antitumorais, herbicidas e enzimas (CORRÊA, 2011).

As propriedades hidrolíticas de enzimas como pectinases, amilases e proteases por serem altamente eficientes e seletivas, podem favorecer e potencializar o desenvolvimento de tecnologias de produção em diversos processos industriais, são menos poluentes, usualmente requerem menos energia e são consideradas de baixo custo, acarretando ao aumento da demanda por novas fontes de compostos principalmente de origem microbiana (BARATTO et al., 2011).

O mercado de enzimas impulsionado pela demanda comercial cresce cerca de 7% ao ano, devido a procura das empresas por processos de baixo custo, com pouco impacto ambiental e possível gerenciamento de resíduos. As principais enzimas encontradas no mercado são pectinases, proteases, amilases e xilanases (BISPO, 2010; GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005; RODRIGUES, 2009).

Segundo a literatura, dentro desse gênero, as bactérias consideradas fitopatogênicas, causadoras da sarna da batata em tubérculos, podem apresentar alta capacidade de secreção de enzimas hidrolíticas devido à relação parasita-hospedeiro que, exige a capacidade de penetração da bactéria na planta, a colonização e a severidade dos sintomas, os fatores de virulência e os mecanismos de infecção. Esses mecanismos utilizados por esses micro-organismos torna possível a investigação do potencial biotecnológico dessa espécie bacteriana (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007; FISHER et. al., 2003; HOOKER, 1981; SLACK, 1991).

2. Revisão de Literatura

2.1. Actinomicetos

Os actinomicetos são micro-organismos capazes de utilizar diferentes substratos, apresentando diversas vias metabólicas e capacidade de produzir e degradar compostos orgânicos e inorgânicos. Esses organismos adaptaram-se aos mais diversos climas e microambientes, entre eles inóspitos e ambientes ricos em nutrientes. Representam em termos de número de variedade de espécies identificadas, uma das maiores unidades taxonômicas atualmente conhecidas. Esse grupo é constituído por um amplo número de bactérias Gram-positivas, encontradas tanto no solo como na água, que diferem quanto à morfologia e propriedade bioquímica, mas tem como característica comum o alto conteúdo de bases nitrogenadas G+C (guanina e citosina) no DNA, variando de 51% em algumas bactérias do gênero *Corynebacterium*, até mais de 70% em espécies de *Streptomyces* e *Frankia* (GLAZER; NIKAIDO, 2007; VENTURA et al., 2007).

A taxonomia dos actinomicetos é bastante complexa, começando pela morfologia da colônia que dependendo do táxon pode se apresentar como cocos ou bastonetes filamentosos ou, como um micélio estável constituído de filamentos ramificados ou hifas.

Além disso, podem apresentar esporos móveis ou imóveis, os quais estão relacionados à reprodução podendo ser carregados pela água ou por nematóides e artrópodes presentes no solo e são resistentes a dissecação (CORREA, 2015; HOLT et al., 1994,). Tais diferenças foram utilizadas inicialmente para justificar a separação do grupo dos actinomicetos de micro-organismos morfologicamente simples dentro do domínio *Bacteria*. A literatura destaca o potencial desses micro-organismos como uma fonte promissora de produtos naturais, importante na descoberta de moléculas bioativas de diversas classes químicas (CLARDY; WALSH, 2004; EMBLEY; STACKEBRANT, 1984) com aplicação na medicina, uma vez que doenças infecciosas causam aproximadamente 17 milhões de mortes anualmente, afetando principalmente crianças e idosos (PROCÓPIO et al., 2012).

Os estudos com esses micro-organismos tiveram início em 1942 com a descoberta de estreptomicina, impulsionando pesquisas com bactérias do gênero *Streptomyces* para obtenção de novos antibióticos como: nigericina por *Streptomyces* spp. EUCAL 26 (SILVA, 2014), cefalosporina por *Streptomyces clavuligerus*, tetraciclinas por *Streptomyces aureofaciens*, ciclosporina por *Streptomyces garyphalus*, fosfomicina por *Streptomyces fradie*, platensiminas por *Streptomyces platensis* (PROCÓPIO et al., 2012), em 2014, Kannan e colaboradores apresentaram resultados satisfatórios com *Streptomyces rubrolavendulae* ICN3 com potencial atividade antagonista contra cepa de *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA).

Na indústria, por exemplo, foram descobertas *Streptomyces* sp. MC1 produtoras de emulsificantes (COLIN et al., 2013), bactérias que produzem compostos com propriedades antioxidantes (JANARDHAN, et al., 2014), *Streptomyces* sp. na indústria de alimentos para peixes como imunoestimulantes (INDRAKUMAR, 2014), *Streptomyces althioticus* utilizadas na indústria de processamento e branqueamento de pulpas de celulose, produzindo endoxylanases que degradam xylan em xyloosacarídeos (LUO et al., 2016).

Por sua vez, na agricultura já foram descobertas bactérias do gênero *Streptomyces* com capacidade nematicida (RASHAD, et al., 2015; ZENG et al., 2013) e produtoras de fitohormônios (ácido giberélico – GA₃, ácido indol acético – IAA, ácido abscísico- ABA e cintocininas como cinetina – KI e benziladenina –BA) (RASHAD et al., 2015). Também foram relatadas bactérias desse gênero apresentando atividade inseticida contra *Helicoverpa armigera* (GOPALAKRISHNAN et al., 2016) (lagarta que causa prejuízos, principalmente, às lavouras de milho, soja e algodão) (<https://www.embrapa.br/alerta-helicoverpa>) e *Streptomyces mauvecolor* BU16 com atividade antifúngica produzindo rimocidina com efeitos satisfatórios sobre antracnose de pimentão (JEON et al., 2016).

Os actinomicetos são organismos essenciais na decomposição de compostos orgânicos, ciclagem de nutrientes e dos poluentes ativos na natureza. Enzimas produzidas por essas bactérias estão sendo bastante utilizadas na agricultura e em muitas indústrias como do couro, na alimentícia, na têxtil, entre outras. Desempenham um papel importante em aplicações biotecnológicas de pesquisa e desenvolvimento, aumentando a demanda por enzimas mais estáveis, com alto potencial de atuação e especificidade (BELFAQUIH; PENNINGCKX, 2000; BHAT, 2000; BÖCKLE et al., 1995; GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005; STUZENBERGER; BODINE, 1998).

As propriedades metabólicas e fisiológicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma grande variedade de metabolitos, tornam esse grupo de organismos uma das principais fontes de novos compostos bioativos. Mais de 60% das drogas aprovadas na indústria farmacêutica, nos últimos 50 anos, são derivadas de compostos naturais, dos quais, 50% dos antibióticos são produzidos por micro-organismos desse grupo. Podem, também, promover ou inibir o crescimento de outros micro-organismos, sendo assim, utilizados como controle biológico (CRAGG et al., 2005; MANN, 2001; NEVES; GAVA, 2008; RAVIKUMAR et al., 2012; RODRIGUES, 2009).

2.2. Potencial Biotecnológico das actinobactérias

Os micro-organismos são os maiores reservatórios de compostos naturais potencialmente valiosos, tais como policetídeos, PKS, (do inglês *polyketide synthases*), peptídeos não ribossomais, NRPS, (do inglês *non-ribosomal peptide synthetase*) e alcaloides que são enzimas multifuncionais as quais possuem uma organização modular dos genes que as codificam, contendo regiões de sequências altamente conservadas (ZHAO et al., 2008; GINOLHAC et al., 2004). A bioprospecção de novos compostos bioativos naturais tem como foco a detecção de novos PKSs e NRPSs, os quais são sintetizados por bactérias, fungos e plantas (MOFFITT; NEILAN, 2003). A síntese de PKSs e NRPSs resulta numa ampla diversidade de compostos biologicamente ativos, incluindo antibióticos, toxinas, sideróforos e imunossupressores (CROSA; WALSH, 2002).

As PKSs catalisam a formação de policetídeos por meio de sucessivas reações de condensação do tipo Claisen, uma reação química orgânica que se dá entre dois ésteres e uma cetona em presença de uma base forte, formando uma ligação simples carbono-carbono (C-C). As enzimas são constituídas por vários domínios contendo uma composição mínima encontrada em todas elas: cetossintase (KS), responsável pela ligação C-C; acetiltransferase (AT), que introduz unidades malonila, metilmalonila-CoA, ou outras

subunidades ativadas durante a extensão da cadeia; domínio da proteína carreadora (ACP) e um domínio finalizador ou domínio tioesterase (TE – alocado no último módulo enzimático) (DA-CRUZ, 2011; OLIVEIRA, 2007).

Primers degenerados foram desenhados para amplificar as enzimas KS e o domínio A (de adenilização e cetossintase-metilmalonila transferase) dos módulos PKS e NPRS, respectivamente, por serem estes os domínios mais conservados (MOFFITT; NEILAN, 2003; SCHIRMER et al., 2005). Os *primers* conservados têm sido utilizados para estudar a distribuição e diversidade dos genes PKS e NPRS em fungos (NICHOLSON et al., 2001), micro-organismos associados a esponjas marinhas (SCHIRMER et al., 2005), cianobactérias e micro-organismos do solo (GINOLHAC et al., 2004).

Alguns actinomicetos, bacilos e fungos que vivem no solo são saprófitas, podendo participar da degradação e reciclagem natural de biopolímeros. Esses micro-organismos apresentam alta capacidade de produzir e excretar uma vasta variedade de metabólitos biologicamente ativos como substâncias antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias, herbicidas e enzimas. No passado, esses micro-organismos foram de grande interesse devido à produção de antibióticos não-ribossômicos, como a actinomicina, gramicidina S e ciclosporina (imunossupressora) (ALBERTON et al., 2006; KLEINKAUF, VON DÖHREN, 1990; SEMÉDO et al., 2004).

Os antibióticos apresentam grande importância, sendo 75% comercialmente importantes especialmente os pertencentes a classe dos aminoglicosídeos, macrolídeos, lipopeptídeos, glicopeptídeos (MIYADOH, 1993; PADILHA, 1998; SALOMONI, 2009).

Acredita-se que novos antibióticos e outros metabólitos bioativos como enzimas podem ainda ser descobertos de fontes microbianas, e nesse sentido, linhagens de *Streptomyces* são organismos promissores, pois apresentam alta capacidade de produzir e excretar uma vasta variedade de metabólitos biologicamente ativos (CORRÊA, 2011).

Estudos da ocorrência de doenças infecciosas, seus riscos e por sua vez medidas de prevenção e controle são de extrema importância, pois afetam diretamente a população (VILLAS BÔAS; RUIZ, 2004). Deste modo, a identificação de micro-organismos úteis para biocontrole de doenças, obtenção de novos compostos bioativos e antibióticos representam grande interesse para a medicina e agricultura moderna (EVANGELISTA-MARTÍNEZ; MORENO-ENRÍQUEZ, 2007).

Originalmente a busca por compostos se realiza seguindo vários passos, entre eles: 1) a escolha dos micro-organismos; 2) crescimento desses; 3) triagem da capacidade de inibição dos micro-organismos contra patógenos; 4) recuperação das substâncias ativas produzidas (EVANGELISTA-MARTÍNEZ; MORENO-ENRÍQUEZ, 2007).

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos têm levado à seleção de micro-organismos patogênicos mutantes e resistentes, como

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS et al., 2004).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-negativa capaz de crescer em diversos tipos de superfícies, como solo, tecidos humanos e ambientes marinhos, formando biofilme são um dos principais micro-organismos causadores de infecções em diversos sítios do corpo humano, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Amplamente distribuída no ambiente sendo capaz de persistir por longos períodos em ambientes adversos e desenvolver resistência a agentes antimicrobianos, por essa razão as infecções causadas por *P. aeruginosa* estabelecem um substancial desafio para a terapia antimicrobiana (FUENTEFRÍA et al.; 2008; STOVER et al.; 2000).

Escherichia coli também é uma bactéria Gram-negativa, não esporulada, faz parte do grupo de coliformes fecais sendo considerado o mais específico indicador de contaminação fecal e eventual presença de bactérias patogênicas, apresentam habilidade de crescimento em diversos substratos e multiplicam-se rapidamente podendo haver alta taxa de mutação. A patogenicidade de *E. coli* se manifesta por um mecanismo complexo e multifatorial que envolvem vários fatores de virulência, que variam de acordo com o sorotipo (FRANCO, 2002).

A capacidade de *E. coli* em resistir aos efeitos bactericidas do sistema complemento no soro do hospedeiro é mediada por estruturas da superfície bacteriana como cápsula, lipossacarídeos, produção de colicina e proteínas da membrana externa que são associadas à patogenicidade. Tais características tornam essas bactérias causadoras de diversas doenças humanas e por isso novos medicamentos e tratamentos são estudados (CORRÊA, 2012).

No grupo das bactérias Gram-positivas os *Staphylococcus aureus* são considerados uma das principais causas de doenças veiculadas por alimentos, decorrente da sua alta prevalência e do risco de produção, nos alimentos contaminados, de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (intoxicações alimentares). É considerado também o principal agente de mastites em rebanhos leiteiros mundialmente, causando as maiores perdas econômicas na produção de leite (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

As doenças de origem alimentar são amplamente reconhecidas pelos efeitos agudos no trato gastrointestinal. As bactérias Gram-positivas pertencentes à espécie *Bacillus cereus* produzem endósporos, garantindo a sobrevivência da bactéria por períodos de estresse ambiental, dessa forma podem contaminar os alimentos normalmente durante o manuseio, processamento, estocagem ou distribuição. Alguns estudos mostraram que os micro-organismos também são capazes de crescer em ambientes refrigerados, tornando-se um problema econômico para diversas indústrias e um transtorno para as pessoas que entram em contato com esse organismo (MENDES; COELHO; AZEREDO, 2011).

Bactérias do gênero *Streptomyces* possuem um papel importante na degradação da matéria orgânica devido à sua atividade enzimática, atuando na decomposição de diversas macromoléculas como proteínas, celulose, amido, pectinas e quitina (DUARTE et al., 2009; GUPTA et al., 1995).

Enzimas são catalisadores de reações químicas, envolvendo reações com substratos orgânicos e inorgânicos, sendo assim amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, de detergentes, têxteis e cosméticas (FREDONIA, 2010), as enzimas com maior importância industriais utilizadas atualmente incluem proteases, enzimas que hidrolisam carboidratos (amilases e pectinases) e enzimas lipolíticas, os *Streptomyces* destacam-se entre os actinomicetos pela capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas com aplicação industrial (DUARTE, et al., 2009).

2.3. Mercado Enzimático

No que diz respeito ao mercado de enzimas, a demanda global aumentou 6,3 %, chegando a US\$ 7 bilhões, impulsionado pela forte demanda no segmento de enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa), e enzimas técnicas (utilizadas na indústria como a de fabricação de ração animal e nos mercados de produção de etanol) (FREDONIA, 2010). Tal montante justifica-se pelo interesse gerado por processos que envolvem tecnologias de baixo custo energético, com baixo impacto ambiental e que utilizam matérias-primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria. Em termos percentuais, as enzimas de uso industrial representam mais de 60 % do mercado mundial de enzimas (BON et al., 2008).

As principais enzimas técnicas utilizadas na indústria são: proteases, amilases, lipases, pectinases, xilanases e fitases (BON et al., 2008).

As propriedades hidrolíticas de enzimas como pectinases, amilases e proteases podem favorecer o desenvolvimento das tecnologias de produção de combustíveis líquidos (álcool, biodiesel), solventes, plásticos biodegradáveis, bem como produtos de química fina como corantes e defensivos agrícolas, desenvolvimento de sabores, fragrâncias e produtos farmacêuticos para uso humano e veterinário, a partir de matérias primas renováveis, processos menos agressivos, economicamente viáveis e ecologicamente aceitáveis (DUARTE et al., 2009).

Os processos industriais que empregam enzimas são, em geral, relativamente simples, fáceis de controlar, energeticamente eficientes e de baixo custo. O melhoramento dos processos industriais usando as enzimas produzidas por microrganismos é um importante campo na pesquisa, pois são altamente eficientes e seletivas, menos poluentes, usualmente requerem menos energia, bem como baixos custos (DUARTE et al., 2009; CHERRY; FIDANTSEF, 2003; RODRIGUES, 2009).

A ampla diversidade das enzimas potencializa sua aplicação em diferentes processos na indústria, assim, frente à demanda por novas hidrolases com prospecção de aplicabilidade no setor, há um estímulo natural pela exploração da biodiversidade microbiana, com o isolamento e seleção de novas cepas produtoras de enzimas (BARATTO et al., 2011).

2.3.1. Amilases

As amilases são responsáveis pela degradação da molécula de amido. O amido é encontrado principalmente em sementes de cereais como milho, cevada, trigo e arroz e em tubérculos ou raízes como batata e mandioca (RODRIGUES, 2009; BARATTO et al., 2011).

As amilases podem ser divididas em: α -amilase EC 3.2.1.1, uma endo-enzima que hidrolisa ligações α -1,4 –glicosídicas de moléculas de amido, glicogênio e outros α -1,4-glicanos, liberando, principalmente, oligossacarídeos de 6-7 unidades de glicose e, posteriormente, açúcares redutores. Esta enzima apresenta estabilidade térmica, labilidade ácida e aumento da estabilidade na presença de íons de cálcio; β -amilase EC 3.2.1.2, é uma exoenzima que catalisa a hidrólise alternada de ligações α -1,4 β -glicosídicas de polissacarídeos, liberando moléculas de maltose, apresentando labilidade térmica; *Glucosidase* ou *exo- α -1,4-D-glicosidase* EC 3.2.1.3, é uma enzima que hidrolisa ligações α -1,4 –glicosídicas liberando unidades de β -D-glicose; *iso-amilase* ou *pululanase* EC 3.2.1.68, são enzimas que hidrolisam ligações α -1,6-D-glicosídicas de polissacarídeos ramificados (ENZIMAS, 2008).

As amilases representam 25% a 30% das vendas no mercado de enzimas (DUARTE et al., 2009) e desempenham um papel de importância biotecnológica em muitos processos de fabricação industrial tais como têxteis e papel e indústrias de alimentos, nestas são utilizadas na sacarificação, fabricação de cerveja, panificação, cereais para alimentação infantil. São utilizadas na fabricação de detergentes, aplicações nas indústrias de couro, ração animal, indústria química e farmacêutica. (COTARLET et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

Grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e tem aplicação a hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (GUPTA et al. 1995; PANDEY et al. 2005).

Cotârlet e colaboradores (2011) isolaram e caracterizaram bactérias do gênero *Streptomyces* oriundas de vegetação da Antártica e a partir desses resultados foi possível a identificação de linhagens produtoras de amilases, entre elas estão: *S. fradie*, *S. griseus*, *S. lividans*, *S. peptidofaciens* e *S. rimosus* s, e α -amilases foram produzidas por *S. aureofaciens*, *S. rimosus*, *S. gulbargensis*, *S. hygrosopicus*, *S. preacox*.

2.3.2 Pectinases

Pectinases ou enzimas pectinolíticas desempenham na natureza papel fundamental atuando na maceração de tecidos de plantas pela degradação da pectina localizada na lamela média e na parede celular primária de plantas superiores (DUARTE et. al., 2009). As enzimas pectinolíticas ocupam um papel essencial na infecção e patogênese de plantas auxiliando a entrada de micro-organismos patogênicos nas células do hospedeiro (WHITAKER, 1989).

Os polissacarídeos pécticos são ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. As substancias pécticas são formadas por duas frações interligadas: a ramnogalacturonana, um heteropolímero que tem estrutura principal formada por repetidas unidades de ácido galacturônico ligado a ramnose e cadeias laterais e a homogalacturonana, um homopolímero formado por unidades de ácido galacturônico e/ou o seu metil éster unidos por ligações glicosídicas α -1,4, devido a sua capacidade de ligar-se a Ca^{++} , aumentando a viscosidade e formando gel. As pectinas são classificadas em desmetoxilantes e despolimerizantes – liases e hidrolases (DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

Deste modo pectinases são de grande importância biotecnológica em vários setores da indústria, utilizadas no setor comercial, especialmente na indústria de sucos, são empregadas na viscosidade e turbidez do produto, acelerando a fermentação de chás, e também impedindo a formação de espumas, no café, removem mucilagens que recobrem os grãos. São empregadas na indústria de alimentos e na indústria de produção de ração para animais. Amplamente utilizadas na indústria de papel e têxtil. (BEG et. al., 2000; BHAT, 2000; LADJAMA; TAIBI; MEDDOUR, 2007; RODRIGUES, 2006).

São produzidas por um grande número de bactérias, onde 25% da venda enzimas global é de origem microbiana, o restante inclui leveduras, fungos, insetos, nematódeos e plantas (DUARTE et. al., 2009)

O aumento da demanda por enzimas mais estáveis, com alto potencial de atuação e especificidade está crescendo rapidamente e por sua vez, as pectinases de estreptomicetos têm boa estabilidade térmica e pode ser utilizada em várias aplicações industriais que exigem o uso de elevadas temperaturas, extremos de pH e concentrações iônicas (ARIJIT et. al., 2013; BHAT, 2000;), Beg e colaboradores (2000) conseguiram caracterizar pectinases com essas características a partir de linhagem de *Streptomyces* sp. QG-11-3 provenientes da decomposição de fibras de coco em Goia, na Índia.

2.3.3. Proteases

Proteases são hidrolases que atuam nas ligações peptídicas de cadeias protéicas, catalisam a hidrólise de proteínas a polipeptídeos e de oligopeptídeos a aminoácidos. Estão amplamente distribuídas na natureza, detectadas em micro-organismos, plantas e animais (ROMERO et al., 2001), estão associadas a importantes processos biológicos tais como: a digestão proteica, coagulação sanguínea e morte celular (DUARTE, et al. 2009).

As proteases representam o grupo mais importante de enzimas industriais, cerca de 60% do mercado enzimático total, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais e têm ampla gama de aplicações (JAYASREE et al., 2009; DUARTE et al., 2009).

A principal aplicação de proteases na indústria leiteira é para a fabricação de queijo (DEMAIN; ADRIO, 2008). Na indústria alimentícia, são largamente utilizadas para o amaciamento de carne, clarificação da cerveja, panificação, hidrólise de soja, produção de aspartame, alimentos dietéticos e em alguns alimentos para melhorar seu sabor, textura, funcionalidade e qualidade nutricional. Nos curtumes são utilizadas no amaciamento do couro e na degradação de resíduos. Já na indústria farmacêutica, essas enzimas proteolíticas são empregadas em medicamentos para distúrbios de digestibilidade, apresentando também ação antiinflamatória, antimucolítica e cicatrizante (BIRSCHBACH et al., 2004).

Proteases bacterianas são mais significativas em comparação com proteases animais e de origem fungica porque apresentam uma área maior de aplicações, são mais baratas e estáveis (JAYASREE et al., 2009) e estão entre as mais valiosas enzimas comerciais, porém proteases de actinomicetos não recebem uma atenção semelhante (GHORBEL et al., 2014).

Alguns *Streptomyces* spp. isolados por Cotarlet e colaboradores (2011) apresentaram ótima produção de proteases, em particular: *S. clavuligerus*, *S. griseus*, *S. moderatus*, *S. rimosus*, *S. thermoviolaceus*, *S. thermovulgaris*, *S. avermectinus*, *S. pactum* e *S. gulbargensis*, onde a biossíntese máxima de protease foi detectada depois de nove dias de cultivo durante a fase estacionária de crescimento das bactérias.

Em 2014, Gorbel e colaboradores isolaram uma linhagem de *Streptomyces flavogriseus* produtora de pelo menos cinco isoformas diferentes de proteases a partir de análises de zimograma em gel (técnica que detecta enzimas hidrolíticas baseada no substrato utilizado) e relataram que estas enzimas mostraram-se úteis como aditivo para detergentes.

A literatura indica que as bactérias filamentosas como as do gênero *Streptomyces* apresentam ótima produção de protease e amilases estão na fase estacionária de crescimento, com aproximadamente 144 horas a 166 horas com temperatura média de 20 °C.

2.4. Gênero *Streptomyces*, sarna da batata e ciclo da doença

As bactérias do gênero *Streptomyces*, assim como todas pertencentes ao grupo dos actinomicetos, são gram-positivas, apresentam estrutura filamentosa e esporos, e em sua maioria um único cromossomo linear (LIN et al., 1993). O gênero *Streptomyces* compreende cerca de 787 espécies (<http://www.bacterio.net/streptomyces.html>), sendo algumas fitopatogênicas associadas à doença denominada sarna da batata, mas a maior parte delas é saprófita, que vive no solo, participando dos processos de ciclagem de nutrientes (LORIA; KERBS; JOSHI, 2006), formação do húmus (PADILHA, 1998).

2.4.1 *Streptomyces* spp. fitopatogênicas

Diferentes espécies de *Streptomyces* estão associadas a uma única doença denominada sarna da batata. Essa doença pode ser causada por *Streptomyces scabiei* (LAMBERT; LORIA, 1989a) principal espécie causadora da sarna da batata, *S. acidiscabies* (LAMBERT; LORIA, 1989b), *S. caviscabies* (sin. *S. griseus*)/*S. setonii* (sin. *S. griseus*) (GOYER; FAUCHER; BEAULIEU, 1996; LIU et al., 2005; MILLARD; BURR, 1926); *S. turgidiscabies* (MIYAJIMA et al., 1998), *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000), e *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei* e *S. niveiscabiei* (PARK et al., 2003). Ainda, foram descritas duas outras espécies na América do Norte, *S. sp. IdahoX* e *S. sp. DS3024* (HAO et al., 2009; WANNER, 2007).

Também foram descritas as espécies *S. reticuliscabiei*, descrita na França (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000), *S. aureofaciens* e *S. griseus* (FAUCHER et al., 1993), *S. sampsonii*, considerada saprófita, porém a mesma já foi isolada de lesões de sarna (LAMBERT; LORIA, 1989a) e *S. ipomoeae* que causa a sarna em batata-doce (LABEDA; LYONS, 1992; PERSON; MARTIN, 1940; WAKSMAN; HENRICI, 1941).

Essa doença é caracterizada por lesões superficiais ou necroses profundas nos tubérculos (Figura 1), afetando a qualidade da batata e limitando a produção e a comercialização do produto, a severidade da doença e a ocorrência dos sintomas podem variar de acordo com o ambiente, suscetibilidade da cultivar e virulência do patógeno, relacionado a profundidade da lesão (LORIA et. al., 1997).



Figura 1. Lesões nos tubérculos de batata causadas por *Streptomyces* sp. (Fonte: Corrêa, 2011)

As bactérias do gênero *Streptomyces* apresentam ciclo de vida com produção de hifas aéreas que formam cadeias de esporos. Os esporos são uninucleados, resistentes à seca e podem ser dispersos por hidrocória (pela água) ou por nematóides e artrópodes presentes no solo. Os esporos germinam e formam micélios ramificados multinucleados (LORIA; KERS; JOSHI, 2006) (Figura 2).

O crescimento do micélio vegetativo não ocorre indefinidamente. A privação de nutrientes e outros fatores ambientais ativam o desenvolvimento de hifas aéreas, que se fragmentam formando as cadeias de esporos (AGRIOS, 1997) (Figura 2). A cadeia de esporos e os esporos podem apresentar diferentes colorações, sendo essas, características taxonômicas importantes (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).



Figura 2. Ciclo da sarna da batata (Fonte: Agrios, 1997)

A sarna já foi relatada em todo o mundo e no Brasil é considerada uma das doenças mais economicamente importante, pois é um fator limitante para o cultivo nas regiões produtoras do país (CORREA, 2011). A patogenidade de *Streptomyces* é proveniente principalmente da capacidade de evasão do sistema de defesa da planta através da produção de fitotoxinas, como taxtominas, que induzem a produção de suberina nas células adjacentes e levam a formação de uma camada corticosa ao redor do tecido infectado e também da proteína indutora de necrose. Segundo Fisher e colaboradores (2003), a correlação entre a secreção de enzimas hidrolíticas e a severidade dos sintomas tem sido estabelecida.

As bactérias desse gênero possuem um papel importante na degradação da matéria orgânica devido à sua atividade enzimática, atuando na decomposição de diversas macromoléculas como proteínas, celulose, amido, pectinas e quitina (DUARTE et al., 2009; GUPTA et al., 1995).

Enzimas são catalisadores de reações químicas, envolvendo reações com substratos orgânicos e inorgânicos, sendo assim amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, de detergentes, têxteis e cosméticas (FREDONIA, 2010), as enzimas com maior importância industriais utilizadas atualmente incluem proteases, enzimas que hidrolisam carboidratos (amilases e pectinases) e enzimas lipolíticas, os *Streptomyces* destacam-se entre os actinomicetos pela capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas com aplicação industrial (DUARTE, et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo investigar o potencial biotecnológico de diferentes linhagens de *Streptomyces* spp. fitopatogênicas; avaliar a atividade antimicrobiana e a produção de enzimas extracelulares.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença dos genes PKS (policetídeo sintase) e NRPS (peptídeo sintetase não ribossomal), que codificam enzimas funcionais relacionadas à atividade antimicrobiana;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de linhagens de *Streptomyces* spp. contra micro-organismos associadas a doenças clínicas e hospitalares como infecções hospitalares, causada por *Pseudomonas aeruginosa*; gastroenterites causadas por *Escherichia coli*; intoxicações alimentares causadas por *Staphylococcus aureus* e transtornos gastro intestinais agudos causados por *Bacillus cereus*;
- Avaliar a produção das enzimas extracelulares: amilase, pectinase e protease.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens de *Streptomyces* e condições de cultivo

Sessenta e quatro linhagens de *Streptomyces* spp., cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas, SP (Tabela 1) foram investigadas nesse estudo.

Durante os experimentos as linhagens foram semeadas em meio de cultura YME, incubadas por aproximadamente sete dias a 28 °C e mantidas no mesmo meio.

Tabela 1. Linhagens de *Streptomyces* sp. utilizadas nesse estudo.

Gênero/Espécie	IBSBF	Procedência	Variedade	
<i>S. scabiei</i>	1884	Capão Bonito (SP)	Ágata	
	1886	Ibicoara (BA)	Monalisa	
	1936	Itapeva (SP)	Monalisa	
	2005	Cristalina (GO)	Ágata	
	2006	Chile	Atlantic	
	2124	Bueno Brandão (MG)	Monalisa	
	2147	Ibicoara (BA)	Ágata	
	2203	Tambaú (SP)	Ágata	
	2204	Tambaú (SP)	Monalisa	
	2228	Ibicoara (BA)	Ágata	
	2243	Ipuiuna (MG)	Cupido	
	2248	Itapetininga (SP)	Ágata	
	2250	Ibicoara (BA)	Mondial	
	2257	Nova Rezende (MG)	Desconhecida	
	2282	Quitandinha (PR)	Ágata	
	2292	São Mateus (PR)	Cupido	
	2298	São Gotardo (MG)	Ágata	
	2315	Pinhão (PR)	Ágata	
	2316	Perdizes (MG)	Cupido	
	2317	Mucugê (BA)	Cupido	
	2359	Cristalina (GO)	<i>Beta vulgaris</i>	
	2388	Itapetininga (SP)	Asterix	
	2403	Uberaba (MG)	Ágata	
	2475	Ibicoara (BA)	Ágata	
	2500	Casa Branca (SP)	Monalisa	
	2501	Piedade (SP)	Monalisa	
	2502	Bueno Brandão (MG)	Ágata	
	2523	Ibiraiaras (RS)	Cupido	
	<i>S. europaeiscabiei</i>	1943	Holanda	Vivaldi
		1944	Holanda	Baraka
		2162	Holanda	Asterix
		2472	Holanda	Caesar
2473		Holanda	Ágata	
2474		Holanda	Cupido	

Tabela 1. Continuação

Gênero/Espécie	IBSBF	Procedência	Variedade
<i>S. europaeiscabiei</i>	2499	Holanda	Baraka
	2508	Holanda	Ágata
	2498	Holanda	Agata
	2499	Holanda	Baraka
	2508	Holanda	Ágata
	2510	Holanda	Carreira
<i>S. caviscabies</i>	2021	Campinas (SP)	<i>Beta vulgaris</i>
	2236	UFV (MG)	Desconhecida
	2260	Mucugê (BA)	Ágata
	2368	Itapetininga (SP)	Atlantic
	2392	Cristalina (GO)	Cupido
<i>S. sampsonii</i>	2360	Vargem Grande do Sul (SP)	Monalisa
<i>Steptomyces</i> sp.	2019	Cristalina (GO)	Ágata
	2239	Araxá (MG)	Asterix
	2247	Itapetininga (SP)	Cupido
	2343	S. Miguel Arcanjo (SP)	Cupido
	2352	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido
	2390	Casa Branca (SP)	Cupido
	2395	Itapetininga (SP)	Mondial
	2397	Santa Juliana (MG)	Asterix
	2402	Santa Juliana (MG)	Ágata
	2430	Castro (PR)	Atlantic
	2431	Tapira (PR)	Atlantic
	2439	Vargem Grande do Sul (SP)	Ágata
	2449	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido
	2486	Guarapuava (PR)	Ágata
	2503	Ibicoara (BA)	Monalisa
	2507	Ibicoara (BA)	Ágata
	2509	França	Éden
	2520	Paranapanema (SP)	Cupido
2528	Indaiatuba (SP)	Ágata	

IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias – Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Campinas, São Paulo)

4.2 Extração de DNA

As extrações de DNAs cromossômicos das linhagens foram realizadas segundo a metodologia descrita por Pitcher, Saunders e Owen (1989), com algumas modificações.

Uma alça descartável de 10 µL cheia de biomassa de bactéria, contida na placa com meio YME, foi utilizada na extração. As células foram lavadas com 3 mL de tampão NaCl (NaCl 0,1 M e EDTA 0,1 M). O micélio foi desagregado mecanicamente, com auxílio de pistilo, em 1,8 mL de tampão de lise (EDTA 40 mM; Tris-HCl 50 mM pH 8,0; sacarose 0,75 M). Após essa etapa foi adicionado 180 µL de SDS 10% e 90 µL de lisozima (20 mg/mL), misturados com a utilização de agitador de tubos (vortex) e a mistura foi incubada a 37 °C por uma hora. Após isto, foram adicionados 100 µL de proteinase K (10 mg/mL), incubando-

se a 55 °C durante duas horas. Adicionou-se 1 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e após agitação manual vigorosa, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Esse procedimento foi realizado duas vezes. O DNA foi precipitado com 0,1 volume de NaCl 5 M (cerca de 200 µL) e 2 volumes de etanol absoluto (cerca de 4 mL) com incubação *overnight* à -20 °C. A solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos e o sedimento foi lavado de duas a três vezes com etanol 70%, aplicando-se pulsos curtos de até 2 min de centrifugação. O sedimento foi seco à temperatura ambiente e depois suspenso em 400 µL de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris; 1 mM EDTA). Adicionou-se 8 µL de RNase (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37 °C por duas horas. Posteriormente, adicionou-se 80 µL de LiCl (4 M) e o volume de clorofórmio-álcool isoamílico (1:24) (cerca de 500 µL). Após centrifugação de 10 min a 10.000 rpm, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto (cerca de 1 mL) e os sedimentos lavados duas vezes com etanol 70%. Após secar em temperatura ambiente, o DNA foi suspenso em 40 µL de TE pH 8,0 e estocado a 4 °C.

A pureza e quantificação do DNA das amostras foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose 0,6% por comparação com DNA do fago λ. Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação Alpha Innotech 2200.

4.3. Bioprospecção genética do potencial biotecnológico das bactérias

A seleção das linhagens de *Streptomyces* com potencial biotecnológico foi efetuada por amplificação dos sistemas PKS I, PKS II e NRPS com *primers* degenerados descritos na literatura (AYUSO-SACIDO; GENILLOUD, 2005; METSA-KETELA et al., 1999).

A amplificação de sequências conservadas do sistema PKS-I foi obtida com o conjunto de *primers* K1 (5' TSAAGTCSAACATCGGBCA 3') e M6R (5' CGCAGGTT SCSGTACCAGTA 3'); do sistema PKS-II foi amplificado com os *primers* IIPF6 (5' TSGC STGCTTCGAYGCSATC 3') e IIPR6 (5' TGGAANCCGCCGAABCCGCT 3') e as sequências conservadas do sistema NRPS foram obtidas com o par de *primers* A3 (5' GCSTACSYSATSTACACSTCSGG 3') e A7R (5' SASGTCVCCSGTSCGGT AS 3').

Os experimentos de amplificação foram realizados preparando-se reações de 25 µL, contendo 200 ng de DNA genômico, 2,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas); 1X tampão da enzima; 1,5 mM de MgCl₂; 1X BSA (10 mg/mL); 0,2 mM de uma mistura de dNTPs; 0,4 µM de cada *primer*.

Os experimentos foram realizados em termociclador MyCycler, Bio-Rad. Preliminarmente foram realizados testes de gradiente de temperatura com os três pares de *primers* com o objetivo de se obter uma temperatura comum a todos para otimização das reações. As condições das reações foram: um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C de 30 segundos, anelamento de 52 °C a 62 °C de 2 min, extensão a 72 °C de 4 min, seguido por um ciclo de extensão final a 72 °C de 10 min – a partir das análises as melhores condições para utilização dos *primers* e visualização dos produtos foram: 5 min a 95 °C e 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 2 min a 58 °C e 4 min a 72 °C, seguido por extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos obtidos foram analisados e visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % conforme descrito anteriormente. O tamanho dos fragmentos variaram de 1200 a 1400 pb para PKS-I, de 600 a 700 para PKS-II e 700 pb para NRSP, conforme a extensão da região variável das linhagens analisadas.

4.4. Sequenciamento e análise filogenética dos genes PKS-II e NRPS

As linhagens de *Streptomyces* sp. IBSBF 2019 e IBSBF 2397 foram selecionadas para sequenciamento de parte dos genes PKS-II e NRPS, uma vez que apresentaram atividade antimicrobiana contra as quatro bactérias clínicas testadas mesmo não apresentando sinal de amplificação para o gene PKS-I. Nesse experimento também foram incluídas as linhagens de *Streptomyces scabiei* IBSBF 2124, IBSBF 2282, IBSBF 2500, IBSBF 2523, *Streptomyces caviscabies* IBSBF 2236, *Streptomyces* sp. IBSBF 2390.

Os produtos de amplificação correspondentes às partes dos sistemas PKS- II e NRPS das linhagens de *Streptomyces* foram purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Após as purificações, os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro Gene Quant® (GE Healthcare), para posterior sequenciamento.

As reações para sequenciamento foram efetuadas utilizando o kit *Big Dye* (Applied Biosystems), empregando-se os mesmos *primers* da amplificação por PCR e as purificações das reações foram realizadas de acordo com recomendações do fabricante do kit.

As amostras de DNA foram secas, suspensas em tampão apropriado e submetidas à eletroforese no seqüenciador automático, marca Applied Biosystems-Hitachi, modelo ABI Prism 3700 DNA Analyzer. O sequenciamento foi efetuado no Laboratório de Sequenciamento e Genotipagem do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, Campinas, SP com a colaboração do Dr. Márcio José da Silva.

Posteriormente, as sequências alinhadas foram utilizadas na construção de árvores filogenéticas utilizando-se o método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Análises de *bootstrap* com 1000 repetições foram realizadas para prover suporte aos ramos das árvores filogenéticas obtidas, estimando a sua consistência interna. A partir dos dados de alinhamento também foram construídas matrizes de similaridade das sequências, utilizando o parâmetro Kimura 2 de correção (KIMURA, 1980), por meio do programa MEGA 5. As árvores filogenéticas e matrizes de similaridade foram utilizadas para comparação entre linhagens de *Streptomyces* sp.

4.5. Determinação da atividade antimicrobiana de linhagens de *Streptomyces* spp.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de dupla camada. As linhagens de *Streptomyces* spp. foram inoculadas com agulha de platina, em picada, sobre placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo meio de cultura YME e incubadas por 14 dias a 28°C. A disposição das inoculações foi de três linhagens por placa. Após o crescimento, 1 mL de uma suspensão em água destilada de bactérias-alvo com aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL (conforme a diluição 0,5 na escala MacFarland) foi inoculada em 9 mL de ágar Mueller-Hinton (DIFCO®) fundido, e este vertido sobre as culturas nas placas. As placas foram incubadas a 28°C por 24h. A presença de compostos antimicrobianos foi verificada pela observação de halos transparentes ao redor das linhagens de *Streptomyces* spp., indicando ausência de crescimento bacteriano. Os ensaios foram realizados com cinco repetições.

O critério para a escolha dos micro-organismos indicadores foi a de sua importância como causadores de doenças a nível comunitário e hospitalar. Foram avaliadas as seguintes bactérias indicadoras:

- A) Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus* (cepa isolada porco).
- B) Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Escherichia coli* (ATCC 11775).

Os testes e as linhagens bacterianas selecionadas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia Geral e Sanidade Animal do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento do Instituto Biológico de São Paulo e foram também realizados no LBG, com a colaboração da Dra. Alessandra Figueiredo de Castro Nassar.

4.6. Determinação da atividade enzimática de linhagens de *Streptomyces* spp.

4.6.1. Produção de enzimas extracelulares

Foram testados diferentes meios de cultivo e variações da quantidade de nutrientes dos mesmos para melhor avaliação da atividade de cada enzima. A composição destes meios está descritas no Anexo 1.

As bactérias foram inoculadas, em picada com o auxílio de alça de platina reta no centro da placa de Petri (60 mm x 15 mm) contendo o meio de cultivo selecionado. As placas foram incubadas a 28 °C por 14 dias. Após a incubação, foi determinado o potencial enzimático com avaliação de halos de degradação ao redor das colônias. Os testes foram realizados em triplicata.

O potencial enzimático das bactérias do gênero *Streptomyces* foi avaliado para a produção das seguintes enzimas extracelulares: amilase, pectinase e protease.

4.6.1.1. Produção de amilase

A produção de amilase por linhagens de *Streptomyces* spp. foi avaliada em meio YME contendo amido. A hidrólise do amido foi observada, através da adição de 3 mL de lugol (1 mL de Iodo Forte diluído em 19 mL de água destilada). O amido reage com o iodo e fica com uma coloração escura, o que possibilita a observação de halos transparentes ao redor dos das colônias de bactérias consideradas produtoras de amilase.

4.6.1.2. Produção de protease

A atividade proteolítica foi avaliada com a utilização do meio YME contendo 10% do total de nutrientes e adição de Molico® 20%. A formação de uma zona clara ao redor da colônia indicou resultado positivo para produção de protease.

4.6.1.3. Produção de pectinase

A degradação da pectina foi determinada em meio basal com traços de sais, de acordo com protocolo descrito por Shirling e Gottlieb (1996), para actinomicetos. A hidrólise da pectina foi observada, através da adição de 3 mL de lugol (diluição 1:19), o que possibilita a observação da presença de halo claro ao redor das colônias de bactérias consideradas produtoras de pectinase.

As linhagens que apresentaram halo em torno das colônias foram avaliadas pelo índice enzimático (IE), que corresponde à relação do raio do halo de degradação do substrato pelo diâmetro médio da colônia (medido perpendicularmente).

No caso em que os halos eram visíveis em toda a placa as linhagens foram novamente inoculadas nos meios de culturas específicos em avaliação de atividade enzimática, em placa de Petri de 90 mm x 15 mm pela mesma técnica em picada, para avaliação do limite do halo de degradação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Bioprospecção genética do potencial biotecnológico das bactérias

Para analisar a presença dos genes PKS e NRPS nas linhagens de *Streptomyces* spp., foram realizadas amplificações parciais, utilizando pares de *primers* degenerados análogos às regiões conservadas desses genes. A aplicação dessa abordagem molecular aumenta a chance de identificar novos metabólitos cuja produção é dependente dos genes correspondentes.

Todos os produtos de amplificação para bioprospecção dos genes foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, obtendo-se bandas com aproximadamente de 700 pb para NRSP com utilização do par de *primers* A3/A7R (Figura 3); de 600 a 700 para PKS-II, com utilização do par de *primers* IIPR6/IIPF6 (Figura 4); e de 1200 a 1400 pb, com utilização do par de *primers* KI/M6R para PKS-I (Figura 5).

Todas as 65 linhagens analisadas apresentaram resultados positivos para a presença de pelo menos um dos genes biossintéticos (Tabela 2). Para o gene NRPS, apenas seis linhagens (9%) do total não apresentaram sinal positivo de amplificação; para o

gene PKS-I, 20 linhagens (31%) não apresentaram sinal positivo de amplificação; já para o gene PKS-II todas as linhagens (100%) apresentaram sinal positivo de amplificação.

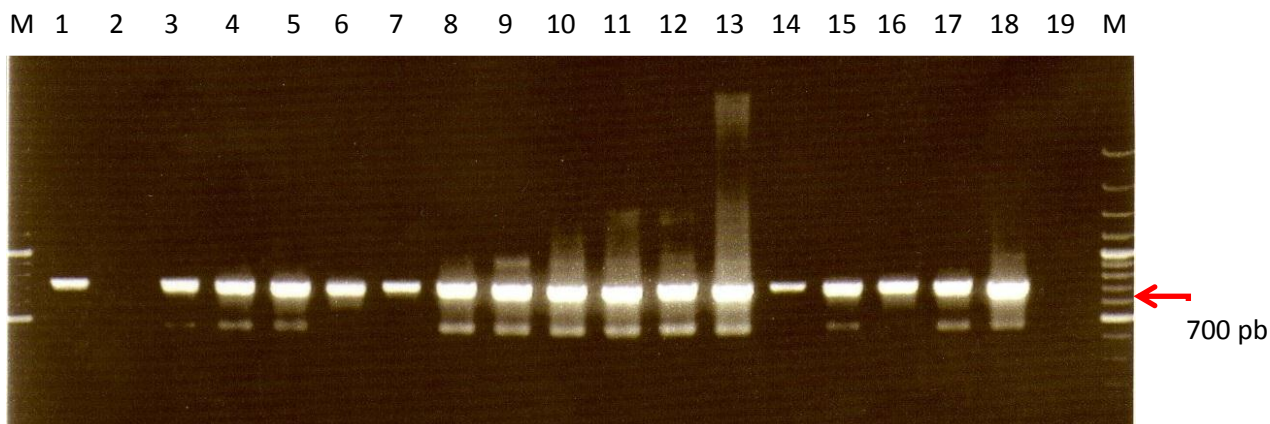


Figura 3. Amplificação de seqüências conservadas do sistema NRPS utilizando-se de par de *primers* A3/A7R. (M) Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); (1) *S. scabiei* (IBSBF 2500); (2) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2510); (3) *S. scabiei* (IBSBF 1886); (4) *S. scabiei* (IBSBF 2298); (5) *S. caviscabies* (IBSBF 2236); (6) *S. sampsonii* (IBSBF 2360); (7) *S. scabiei* (IBSBF 2243); (8) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2498); (9) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 1944); (10) *S. scabiei* (IBSBF 2501); (11) *S. scabiei* (IBSBF 2502); (12) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 1943); (13) *S. scabiei* (IBSBF 2359); (14) *Streptomyces* sp. (IBSBF 2430); (15) *S. caviscabies* (IBSBF 2021); (16) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2474); (17) *Streptomyces* sp. (IBSBF 2402); (18) *S. caviscabies* (IBSBF 2260); (19) controle negativo sem DNA.

Foi possível observar sinal positivo de amplificação do fragmento de 700 pb para 91% (59) das 65 linhagens de *Streptomyces* spp. testadas para o gene NRPS, que está relacionado com a produção de importantes antibióticos como penicilinas, vancomicinas e ciclosporinas. Segundo Janso e Carter (2010) em suas análises o gene NRPS foi detectado em todos os 29 isolados de actinomicetos testados, porém esse gene pode não ser funcional dependendo das condições de cultivo. Resultado similar obtido por Cruz e colaboradores (2015), que verificaram que todos os isolados de actinobactérias endofíticos, identificados como *Streptomyces*, apresentaram sinal positivo de amplificação para o gene NRPS. Por outro lado Qin e colaboradores (2009) observaram a amplificação do fragmento esperado em apenas 12 isolados dos 46 isolados de actinomicetos utilizados em seu estudo. Ayuso (2005) obteve sinal positivo de amplificação com o par de *primers* A3/A7R para 60% (134/ 221) linhagens de *Streptomyces* testadas.

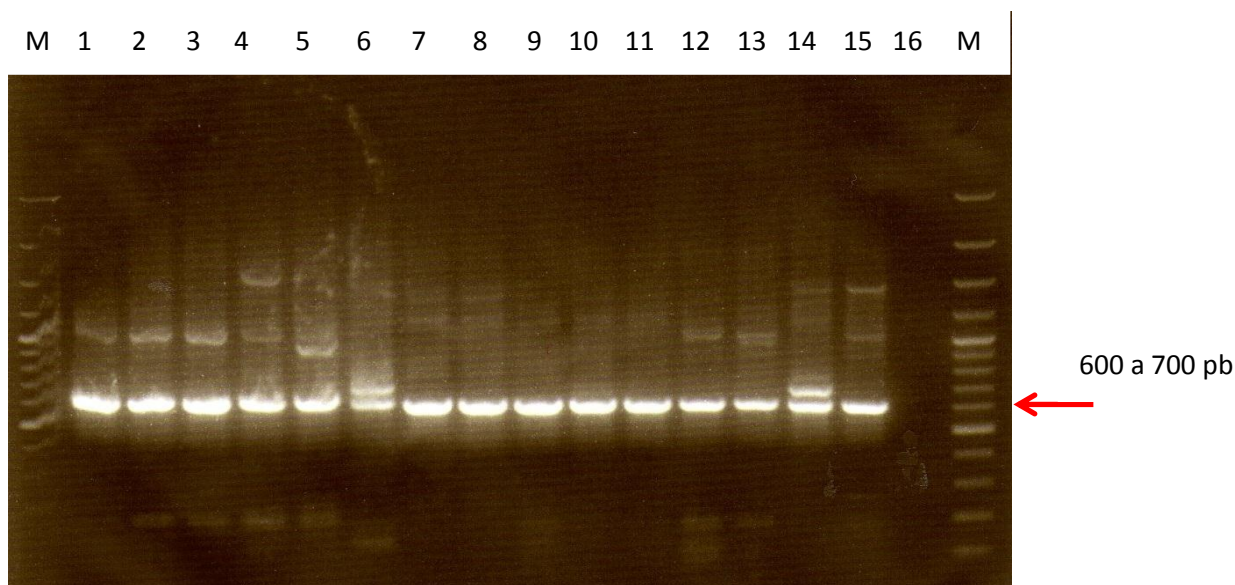


Figura 4. Amplificação do gene PKS-II utilizando-se o par de *primers* IIPF6/IIPR6. (M) Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas); (1) *S. scabiei* (IBSBF 2204); (2) *S. scabiei* (IBSBF 2315); (3) *S. scabiei* (IBSBF 2316); (4) *S. scabiei* (IBSBF 2317); (5) *S. scabiei* (IBSBF 2388); (6) *S. caviscabies* (IBSBF 2392); (7) *Streptomyces* sp. (IBSBF 2439); (8) *Streptomyces* sp. (IBSBF 2486); (9) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2473); (10) *Streptomyces* sp. (IBSBF 2397); (11) *Streptomyces* sp. (IBSBF 2431); (12) *S. scabiei* (IBSBF 2475); (13) *S. scabiei* (IBSBF 2523); (14) *S. caviscabies* (IBSBF 2368); (15) *Streptomyces* sp. (IBSBF 2507); (16) Controle negativo sem DNA.

O fragmento esperado de 600 a 700 pares de bases foi observado em 100% das linhagens de *Streptomyces* testadas nesse procedimento com o par de *primers* para amplificação do gene PKS-II, o qual é responsável pela formação de compostos fenólicos aromáticos (BARRETO et al., 2013). Janso e Carter (2010) obtiveram sinal positivo para 79% (23) dos isolados de actinomicetos provenientes de plantas tropicais testados para este gene. Em 2005, Ayuso e colaboradores utilizaram o par de *primers* KS α /KS β para amplificação do gene que codificam as enzimas do complexo de policetídeos tipo II (PKS-II) e obtiveram sinal positivo de amplificação para aproximadamente 70% dos isolados de *Streptomyces* testados. Resultados completamente diferentes foram obtidos por Qin e colaboradores (2009), onde somente sete dos 46 isolados de actinomicetos oriundos de plantas medicinais de Florestas Tropicais em Xishuangbanna, China, apresentaram sinal positivo de amplificação para este gene, mas, no seu trabalho não havia linhagens pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

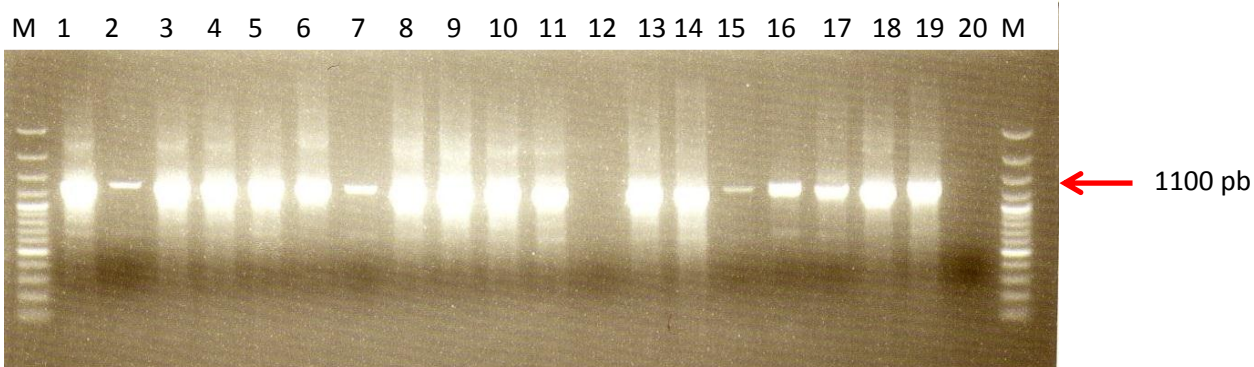


Figura 5. Amplificação do gene PKS-I utilizando-se o par de *primers* Ki/M6R. (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) *S. scabiei* (IBSBF 2500); (2) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2510); (3) *S. scabiei* (IBSBF 1886); (4) *S. scabiei* (IBSBF 2298); (5) *S. caviscabies* (IBSBF 2236); (6) *S. sampsonii* (IBSBF 2360); (7) *S. scabiei* (IBSBF 2243); (8) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2498); (9) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 1944); (10) *S. scabiei* (IBSBF 2501); (11) *S. scabiei* (IBSBF 2502); (12) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 1943); (13) *S. scabiei* (IBSBF 2359); (14) *Streptomyces* sp. (IBSBF 2430); (15) *S. caviscabies* (IBSBF 2021); (16) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2474); (17) *Streptomyces* sp. (IBSBF 2402); (18) *S. caviscabies* (IBSBF 2260); (19) controle negativo sem DNA.

A utilização do par de *primers* Ki/M6R para amplificação do gene PKS-I, possibilitou a observação de sinal positivo de amplificação para 70% das linhagens de *Streptomyces* testadas. Essa via não-ribossomal está envolvida na produção de compostos complexos como antibióticos como rapamicina, rifamicina, nistatina e eritromicina (BARRETO et al., 2013), agentes antitumorais, antiparasitários e imunossupressores (MELO, 2009).

Valores similares para observação de sinal positivo de amplificação para esse gene foram obtidos por Melo (2009) em 90% das 18 linhagens do gênero *Streptomyces* analisadas, outro estudo realizado por Barreto e colaboradores (2013) 75% dos 36 isolados de actinomicetos, Ayuso e colaboradores (2005) detectaram sinais positivos de amplificação desse gene para 70% dos isolados de bactérias do gênero *Streptomyces* e por sua vez Janso e Carter (2010) apresentaram resultados positivos para 66% dos 19 isolados de actinomicetos avaliados em seu estudo. Em contrapartida, Qin e colaboradores (2009) obtiveram resultados positivos para apenas 11% dos 46 isolados de actinobactérias endofíticas analisadas com os *primers* utilizados para o gene PKS-I.

Tabela 2. Avaliação da presença dos genes NRPS e PKS-I e II nas linhagens de *Streptomyces* spp. avaliadas nesse estudo.

Gênero/Espécie	IBSBF	NRPS	PKS-I	PKS-II
<i>S. scabiei</i>	1884	-	+	+
	1886	+	+	+
	1936	+	-	+
	2005	+	-	+
	2006	+	+	+
	2124	-	-	+
	2147	+	+	+
	2203	+	-	+
	2204	+	+	+
	2228	+	-	+
	2243	+	+	+
	2248	+	+	+
	2250	+	-	+
	2257	+	-	+
	2282	-	-	+
	2292	+	-	+
	2298	+	+	+
	2315	+	+	+
	2316	+	+	+
	2317	+	+	+
	2359	+	+	+
	2388	+	+	+
	2403	+	+	+
	2475	+	+	+
2500	+	+	+	
2501	+	+	+	
2502	+	+	+	
2523	-	+	+	
<i>S. europaeiscabiei</i>	1943	+	-	+
	1944	+	+	+
	2162	+	+	+
	2472	+	+	+
	2473	+	+	+
	2474	+	+	+
	2498	+	+	+
	2499	+	+	+
	2508	+	+	+
	2510	-	+	+
<i>S. caviscabies</i>	2021	+	+	+
	2236	+	+	+
	2260	+	+	+
	2368	+	+	+
	2392	+	+	+
<i>S. sampsonii</i>	2360	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	2019	+	-	+
	2397	+	-	+
	2402	+	+	+
	2430	+	+	+

Tabela 2. Continuação.

Gênero/Espécie	IBSBF	NRPS	PKS-I	PKS-II
<i>Streptomyces</i> sp.	2431	+	-	+
	2439	+	-	+
	2449	+	-	+
	2486	+	-	+
	2528	-	+	+
	2247	+	-	+
	2352	+	-	+
	2390	+	+	+
	2395	+	+	+
	2509	+	+	+
	2520	+	+	+
	2503	+	+	+
	2507	+	-	+
	2229	+	+	+
	2343	+	-	+

(+) Sinal positivo de amplificação para determinado gene; (-) Sinal negativo de amplificação.

5.1.1. Determinação da Atividade Antimicrobiana frente a bactérias de importância clínica

Analisando os resultados da atividade antimicrobiana e a árvore filogenética, foi possível observar que algumas linhagens de *Streptomyces* testadas apresentaram atividade frente às bactérias indicadoras, onde as mais sensíveis foram às bactérias Gram-positivas, uma explicação plausível sobre a sensibilidade dessas bactérias, neste teste, está relacionada à parede celular das Gram-positivas, uma vez que não apresentam parede celular quimicamente complexa como as Gram-negativas, ricas em lipopolissacarídeos.

Das 64 linhagens de *Streptomyces* spp. testadas, 21% (14/64) linhagens inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Figura 6A) e 31% (20/64) foram capazes de inibir o crescimento da cepa de *Bacillus cereus* (cepa isolada de porco) (Figura 6B) e

Apenas três linhagens de *Streptomyces* testadas apresentaram halo de inibição contra *Escherichia coli* (ATCC 11775) (Figura 7A), as mesmas apresentaram sinal positivo de amplificação para NRPS e PKS-II e não houve amplificação do gene PKS-I. Foram realizados outros ensaios com gradiente de temperatura e, através desses ensaios foi possível comprovar que, mesmo alterando a temperatura de anelamento dos *primers* para PKS-I de 40 °C até 68 °C, ainda assim não foi possível a observação do sinal de amplificação, indicando que essas três linhagens de *Streptomyces*, provavelmente não possuem o gene que codifica proteínas pertencentes ao sistema PKS-I.

Foi possível observar halos de inibição em 20% (13/64) linhagens de *Streptomyces* spp. testadas frente a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) (Figura 7B).

Das linhagens de *Streptomyces* testadas, 48% (31/64) apresentaram sinal de inibição para pelo menos um dos isolados de importância clínica, dentre elas as linhagens, IBSBF 2019 (*Streptomyces* sp.) e IBSBF 2397 (*Streptomyces* sp.) apresentaram atividade antimicrobiana frente as quatro bactérias indicadoras avaliadas (Tabela 3).

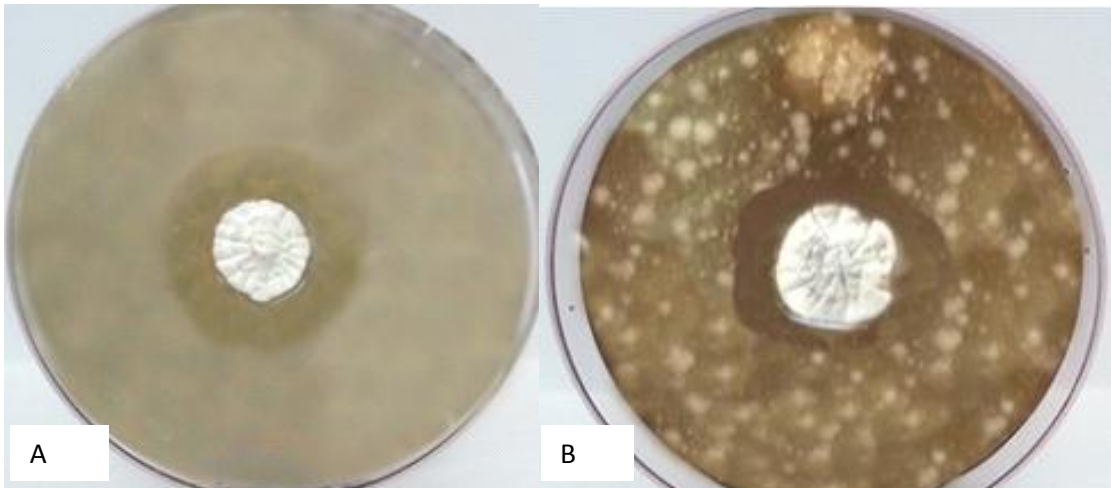


Figura 6. (A) Halo de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* por *Streptomyces caviscabies* (IBSBF 2260). (B) Halo de inibição do crescimento de *Bacillus cereus* por *Streptomyces scabiei* (IBSBF 2292).

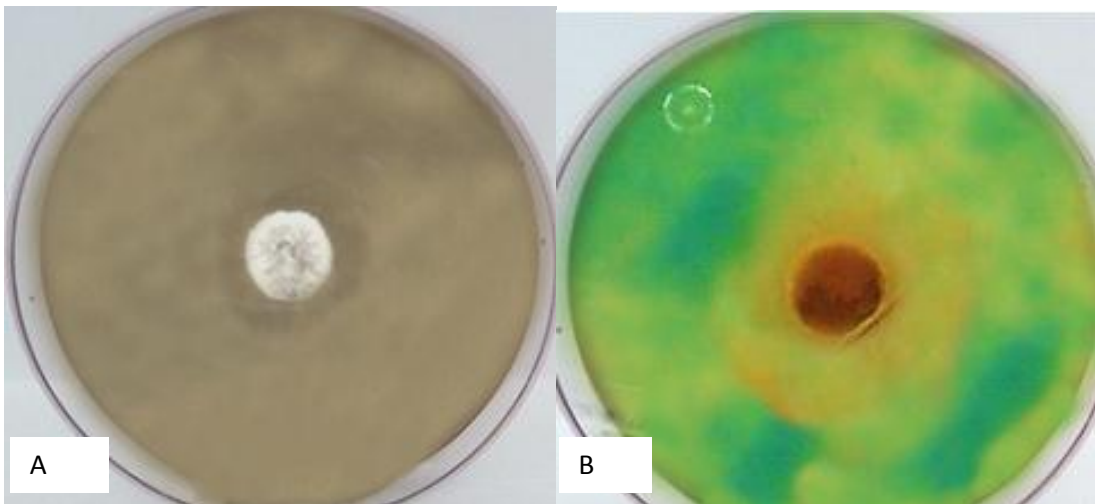


Figura 7. (A) Halo de inibição do crescimento de *Escherichia coli* por *Streptomyces* sp. (IBSBF 2019). (B) Halo de inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* por *Streptomyces* sp (IBSBF 2247).

Tabela 3. Avaliação da atividade antimicrobiana das linhagens de *Streptomyces* spp. frente às bactérias de importância clínica.

IBSBF	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>B. cereus</i> (isolado de porco)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 13388)	<i>E. coli</i> (ATCC 11775)
1884	-	-	-	-
1886	-	+	+	-
1936	-	-	-	-
1943	-	-	-	-
1944	-	-	-	-
1945	-	-	-	-
2005	+	+	-	-
2006	+	+	+	-
2019	+	+	+	+
2021	+	-	-	-
2124	-	+	-	-
2147	-	-	-	-
2162	-	-	-	-
2203	-	-	-	-
2204	-	-	-	-
2228	-	+	-	-
2229	-	-	-	-
2236	+	-	-	-
2243	-	-	-	-
2247	+	+	+	-
2248	-	-	-	-
2250	-	+	+	-
2257	-	-	-	-
2260	+	-	-	-
2282	-	+	-	-
2292	-	+	-	-
2298	-	-	-	-
2315	-	+	+	-
2316	-	-	-	-
2343	-	-	-	-
2352	-	-	+	+
2359	-	-	-	-
2360	-	-	-	-
2368	+	-	-	-
2388	-	-	-	-
2390	-	+	-	-
2392	-	-	-	-
2395	-	-	-	-
2397	+	+	+	+

Tabela 3. Continuação

IBSBF	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>B. cereus</i> (isolado de porco)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 13388)	<i>E. coli</i> (ATCC 11775)
2402	+	+	-	-
2403	-	-	-	-
2407	-	+	+	-
2430	-	+	+	-
2431	+	+	-	-
2439	-	+	-	-
2449	-	+	+	-
2472	-	-	-	-
2473	-	-	-	-
2474	+	-	-	-
2475	-	-	-	-
2486	-	-	-	-
2498	-	+	-	-
2499	-	-	-	-
2500	+	+	-	-
2501	-	-	-	-
2502	-	-	-	-
2503	-	-	-	-
2507	-	-	+	-
2508	-	-	-	-
2509	-	-	-	-
2510	-	-	+	-
2520	-	-	+	-
2523	-	+	-	-
2528	-	-	-	-

(+) Presença de halo de inibição; (-) Ausência de halo inibição.

Dos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana apenas oito linhagens de *Streptomyces* foram capazes de inibir o crescimento das duas bactérias Gram-positivas, mostrando uma baixa taxa de inibição comparado a trabalhos como o de Duarte e colaboradores (2009), que apresentaram resultados promissores, onde todos os isolados de *Streptomyces* sp. testados apresentaram halos de inibição frente a essas bactérias de importância clínica (ATCC 19659 e 25923), mesmo resultado encontrado por Salomoni e colaboradores (2009) (ATCC 33019 e 25923).

Os resultados de Antunes (2013) corroboram com os citados anteriormente onde aproximadamente 80% dos isolados de actinomicetos apresentaram halos de inibição frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus* sp.

Streptomyces são grande reservatórios de compostos bioativos. De acordo com Ratti (2009) o isolado de *Streptomyces tubercidius*, endofítico do cerrado de São Carlos apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias Gram-positivas, entre elas *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

As condições ideais de crescimento de *Streptomyces* sp. visando o potencial antimicrobiano contra bactérias de importancia clinica obtidos por Borba (2013), mostraram que alterando as condições de cultivo: utilizando sacarose como fonte de carbono, uma vez que a redução na taxa de crescimento é um importante sinal para desencadear o metabolismo secundário; a mudança de pH: maior produção do composto em pH 8,0; temperatura: maior produção à 30 °C; favoreceram resultados positivos para a linhagem de *Streptomyces* 8S oriundo de processos de compostagem, apresentando capacidade de inibição frente a bactérias Gram-positivas resistentes do gênero *Staphylococcus* e *Enterococcus* em todos os ensaios.

As bactérias Gram-positivas apresentam diferentes mecanismos de resistência, como a destruição do antibiótico (enzimas catalisam a degradação do antibiótico ou modificam grupos funcionais farmacologicamente importantes, criando funções inativas para o reconhecimento celular; o efluxo contínuo do antibiótico (genes mutantes superexpressam proteínas transportadoras de membrana, fazendo com que a saída do antibiótico para o meio extracelular seja mais rápida que a sua difusão pela membrana bacteriana); e reprogramação e modificação da estrutura-alvo (alvos macromoleculares do antibiótico, como ribossomos, proteínas, etc, são estruturalmente modificados a partir de genes que os expressam, afetando o reconhecimento pelo farmaco. Essas bactérias podem usar apenas um desses mecanismos ou um conjunto deles, sobrepujando os antibióticos mais recentes, por isso a importancia de estudos e obtenções de novos antibióticos.

Com relação às bactérias Gram-negativas, as linhagens testadas no presente estudo não apresentaram potencial de inibição das cepas. Como citado acima, apenas três das 64 linhagens de *Streptomyces* spp. avaliadas apresentaram halo de inibição em relação à *Escherichia coli*, mesmo resultado obtido por Duarte e colaboradores (2009), onde apenas quatro isolados do gênero *Streptomyces* inibiram cepas de *E. coli* (ATCC 25922).

Nenhum dos isolados testados por Rodrigues (2009) apresentou atividade frente às cepas de bactérias Gram-negativas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 6633), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Samonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Serratia marcescens* (ATCC

14756). Por sua vez, Salomoni e colaboradores (2009) obtiveram sucesso com apenas 12% dos isolados de actinomicetos testados.

Em um estudo sobre bactérias Gram-negativas multirresistentes realizado por Carvalho (2014), o isolado do gênero *Streptomyces* R18(6) apresentou atividade contra 20 das 24 cepas de importância clínica, incluindo *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A linhagem inibiu o crescimento das três cepas de *E. coli* e somente de uma cepa de *P. aeruginosa*.

Pesquisas realizadas por Ratti (2013) mostraram que bactérias pertencentes à espécie *Streptomyces tubercididicus* foram capazes de inibir o crescimento de cepas de *E. coli* (ATCC 25922) com halos médios de 40 mm, porém a mesma não foi capaz inibir cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

No presente estudo, as linhagens de *Streptomyces* spp. fitopatogênicas testadas frente ao crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388), 14 apresentaram capacidade de inibir o crescimento desta cepa, porém os resultados obtidos são promissores frente às bactérias de importância clínica, principalmente as Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* são as principais bactérias que causam infecções hospitalares no último século, talvez por consequência da resistência a antibióticos e uso de desinfetantes que eliminam outras bactérias (STOVER et al., 2000).

A alta taxa de mutação das cepas e a capacidade de formar biofilmes complexos em superfícies e até mesmo em reservatórios de água (LIVERMORE, 2002; SAUER et al., 2002) apresentam riscos em praticamente todos os hospitais, estudos como o de Villas-Boas e Ruiz (2004) mostram que aproximadamente 35% dos casos de infecções hospitalares em idosos estão relacionados às cepas de *P. aeruginosa*, Nogueira e colaboradores (2009) encontraram que a maior parte das infecções são causadas por bactérias Gram-negativas e delas, 14% são *P. aeruginosa*

Diversos estudos de avaliação do potencial antimicrobiano contra bactérias de importância clínica, como o de Duarte e colaboradores (2012), assim como o de Vargas e colaboradores (2004) mostraram que cepas de bactérias Gram-negativas muitas vezes apresentam muita resistência frente a ensaios de atividade antimicrobiana.

Ainda não existem dados que possam responder o porquê, no entanto, essas bactérias, apesar de possuírem uma estrutura de parede celular menos rígida do que as Gram-positivas, têm uma parede celular quimicamente mais complexa, sendo que um dos constituintes dessa parede, o lipopolissacarídeo, é o que determina a antigenicidade,

toxicidade e patogenicidade desses micro-organismos. Esse grupo possui também um teor lipídico maior, tais características podem estar envolvidas a resistência frente os ensaios de atividade antimicrobiana (VARGAS et al., 2004)

Existem muitas evidências que a resistência antimicrobiana já esteja presente em ambientes naturais e ocorra de forma natural, por transferência horizontal de genes (FUENTEFRÍA et al., 2008).

Os resultados encontrados nesse estudo corroboram com os resultados de Albertton e colaboradores (2006), assim como Ratti (2013), onde os isolados de *Streptomyces* testados apresentaram efeitos inibitórios sobre bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Bacillus cereus*) em maior porcentagem do que em relação às bactérias Gram-negativas (*E. coli*), porém até o momento, as linhagens de *Streptomyces* fitopatogênicas testadas apresentaram resultados promissores sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, diferente dos encontrados na literatura.

5.1.2. Sequenciamento e análise filogenética dos genes PKS-II e NRPS

Sequências correspondentes aos genes PKS-II e NRPS foram analisadas visando um estudo filogenético de linhagens de *Streptomyces* que apresentaram inibição de crescimento das bactérias indicadoras e amplificação desses genes e árvores filogenéticas foram construídas. As análises foram efetuadas separadamente para cada um dos genes.

Na árvore filogenética obtida para o gene PKS-II (Figura 8), o agrupamento das linhagens de *Streptomyces scabiei* do nosso estudo foi de 100% com sequências de uma linhagem já depositada no GenBank (60644157). As linhagens IBSBF 2390 (*Streptomyces* sp.) e IBSBF 2236 (*Streptomyces caviscabies*) ficaram agrupadas em 72% das repetições, enquanto que as linhagens de *Streptomyces* sp. IBSBF 2397 e 2019, as quais foram capazes de produzir compostos que inibiram o crescimento das quatro bactérias indicadoras destinadas neste estudo, ficaram alocadas com uma linhagem de *Streptomyces pratensis* (ATCC 33331), isolada do solo de pradaria na cidade de Charlotte, Estados Unidos (RONG et al., 2013) em 99% das repetições.

Com relação a árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene NRPS, um número reduzido de linhagens foi analisado, uma vez que as sequências de linhagens de *S. scabiei* desse estudo não apresentaram qualidade suficiente para as análises. Entretanto,

podemos observar que os agrupamentos formados foram os mesmos obtidos nas análises com o gene PKS-II em 100% das repetições. A linhagem de *S. caviscabiei* (IBSBF 2236) ficou agrupada com uma linhagem de *Streptomyces* sp. (CFMR7), isolada na de seringueiras na Malásia em 100% das repetições; enquanto que as linhagens de *Streptomyces* sp. IBSBF 2019 e IBSBF 2397 ficaram agrupadas com uma linhagem de *Streptomyces* sp. (PAMC26508) isolada de líquen da Antártida (Figura 9).

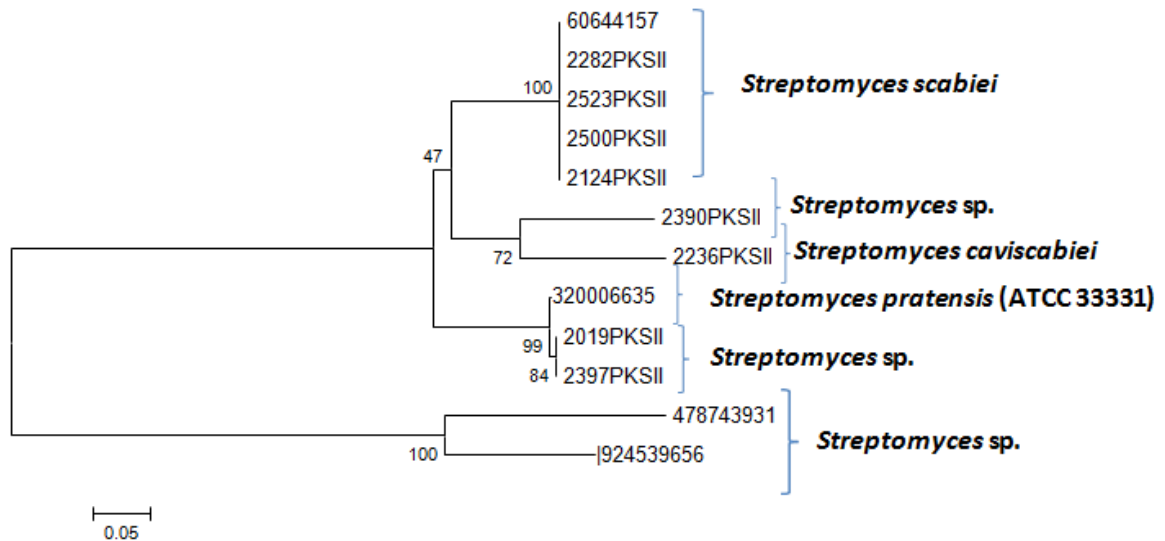


Figura 8. Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene PKS-II de linhagens de *Streptomyces* causadoras da sarna da batata, utilizando-se o método *Neighbor-joining*. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de *bootstrap* de 1000 repetições. A barra indica 5% de diferença nas sequências.

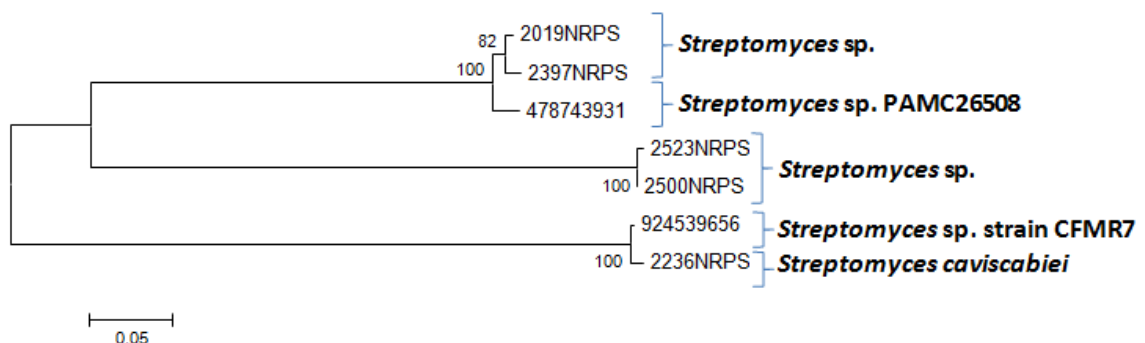


Figura 9. Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene NRPS de linhagens de *Streptomyces* causadoras da sarna da batata, utilizando-se o método *Neighbor-joining*. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de *bootstrap* de 1000 repetições. A barra indica 5% de diferença nas sequências.

Uma análise realizada por Jenke-Kodama e Dittmann (2009), com 17 “clusters” de PKS-I previamente caracterizados para *Streptomyces* revelou que a maioria dos agrupamentos surgiram por meio de eventos de duplicação gênica. Outro evento que poderia causar diversificação genética seria a recombinação intradomínios, possibilitando a um mesmo organismo a produção de vários compostos através de recombinação de módulos de uma determinada via, como substituição de acil-transferases (AT) em módulos de ativação, bem como a perda de módulos de extensão. Genes de vias distintas também podem se recombinar entre si, havendo relatos de substituições de módulos inteiros. Em PKS-I, a substituição de um domínio AT pode levar a diferenciação da própria especificidade ao substrato na via, o que indica que novos produtos podem surgir, uma vez que mudam-se os precursores. Da mesma forma, todos esses eventos podem ocorrer para as vias de PKS-II e as vias híbridas de PKS/NRPS (PIDOT et al., 2008).

Como se não bastasse as possibilidades de recombinações intragenômicas, os eventos comuns de THG (Transferência Horizontal Gênica) em *Streptomyces* magnificam esse efeito recombinatório em muitas ordens de grandeza, justificando a variação dos compostos policetídeos ao longo de milhares de anos de evolução (METSÄ-KETELÄ et al., 1999). De acordo com Fishbach e colaboradores (2008) a evolução coletiva de genes, também explica a diversificação e a propagação das PKS entre vários grupos de micro-organismos.

Um fator decisivo para a propagação das vias de policetídeos é o fato de que muitas vezes estas moléculas irão conferir vantagens adaptativas ao seu hospedeiro, muitas vezes são propagados por plasmídeos.

A produção de um dado composto específico é resultado da interação enzimática peculiar de um grupo de organismos que compartilha uma mesma rota bioquímica para tal metabólito secundário. Para certos tipos de antibióticos, existem organismos produtores do mesmo composto entre linhagens pertencentes a espécies distintas. Existem duas situações que exemplificam o compartilhamento do mesmo metabólito por um dado conjunto de organismos. Um dos exemplos é o que ocorre dentro de espécies filogeneticamente próximas entre si, que por ventura possuam a mesma via biossintética herdada de um grupo ancestral comum (WANG; SIVONEN; FEWER, 2015).

Uma outra possibilidade pode acontecer entre indivíduos de relativo distanciamento filogenético, mas que, no entanto, tenham incorporado “clusters” enzimáticos de outro organismo por transferência horizontal e vertical (WANG; SIVONEN; FEWER, 2015). A troca de genes entre organismos não relacionados filogeneticamente se constitui em um fenômeno de relatada ocorrência dentro do gênero *Streptomyces* (METSÄ-KETELÄ et al., 1999). No caso de antibióticos originados do sistema PKS, embora cada rota bioquímica normalmente resulte em um tipo específico de moléculas, poderão existir dentro de uma

mesma família de PKS enzimas comuns a todas as rotas, derivadas de genes homólogos e detentores de regiões conservadas, ainda que não sejam idênticas entre si (BALTZ, 2006).

Os genes PKS e NRPS apresentam uma distribuição abundante, podendo ser observados em bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Frankia*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, entre outros e em fungos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cochliobolus* e *Pestalotiopsis*.

5.2. Produção de enzimas extracelulares

Nos ensaios para produção de enzimas extracelulares foi avaliada a capacidade das linhagens de *Streptomyces* spp. de hidrolisar os diferentes substratos testados, com a presença de amido, pectina ou leite desnatado Molico®. As linhagens que apresentaram halos de degradação foram analisadas, medindo-se a colônia (perpendicularmente) e o diâmetro do halo (EFFIO; SILVA; PUEYO, 2000) (Figuras 10 a 15) (Tabela 4 – apêndice 1). Após a medição foi realizado o cálculo de Índice Enzimático (IE) (Tabela 5 – apêndice 2), que é uma ferramenta que viabiliza a seleção e a comparação da produção enzimática de diferentes isolados microbianos. Este índice leva em consideração o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos isolados (RODRIGUES, 2009). De acordo com relatos da literatura, índices enzimáticos que apresentem valores maiores que 1,0 são indicativos de excreção de enzimas. Os gráficos abaixo ilustram os IEs obtidos no presente estudo (Figuras 16 a 18) e as medidas dos halos encontram-se no Apêndice 2).

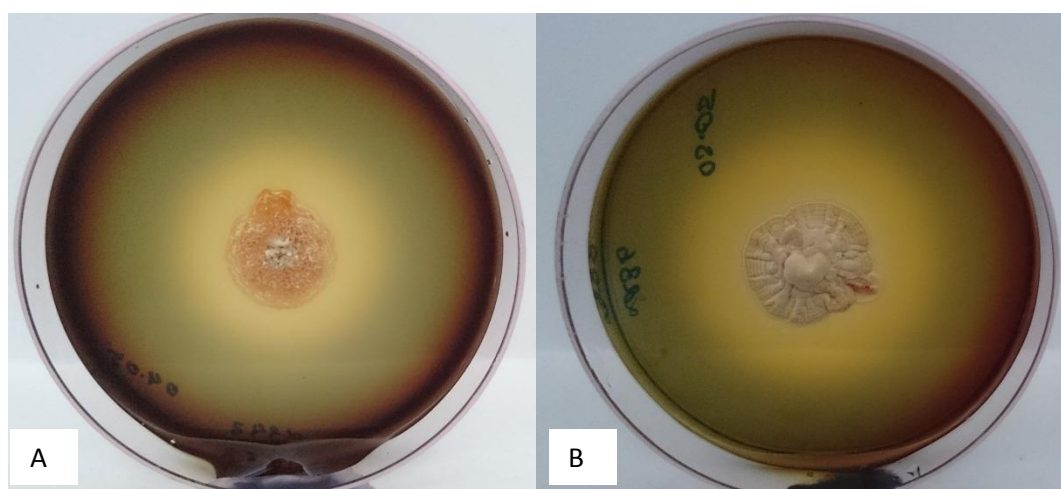


Figura 10. Hidrólise de amido. (A) *Streptomyces* sp. IBSBF 2343; (B) *S. caviscabies* IBSBF 2236.

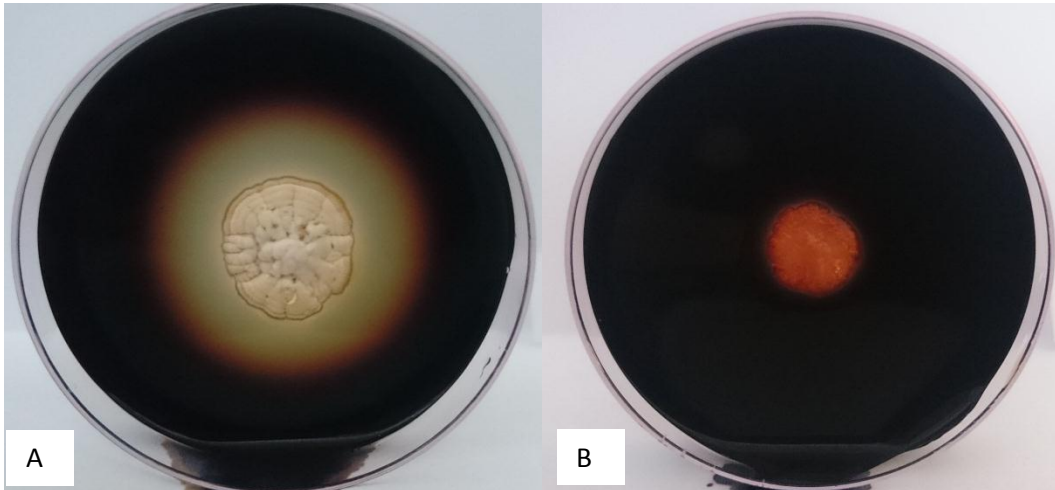


Figura 11. Hidrólise e ausência de hidrólise de amido. (A) *S. europaeiscabiei* IBSBF 1943; (B) *Streptomyces* sp. IBSBF 2395.

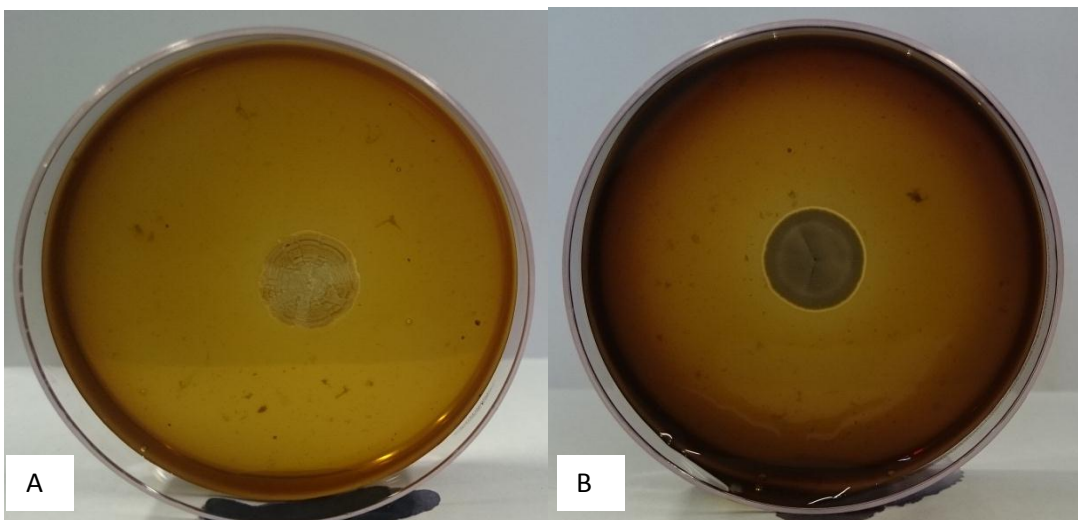


Figura 12. Hidrólise de pectina. (A) *Streptomyces caviscabies* IBSBF 2236; (B) *Streptomyces* sp. BSBF 2397.

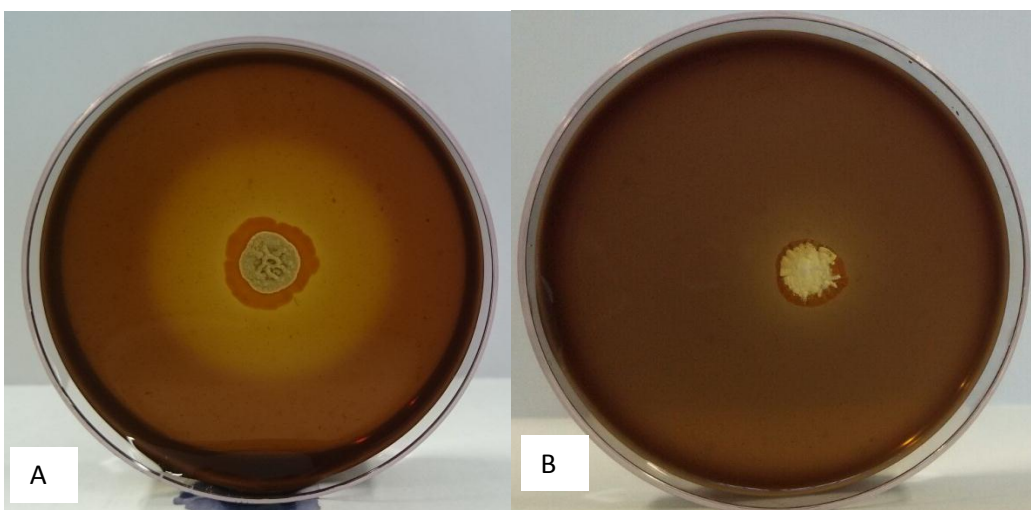


Figura 13. Hidrólise e ausência de hidrólise de pectina realizada por linhagens de *S. europaeiscabiei* (A) IBSBF 2510; (B) IBSBF 2472.

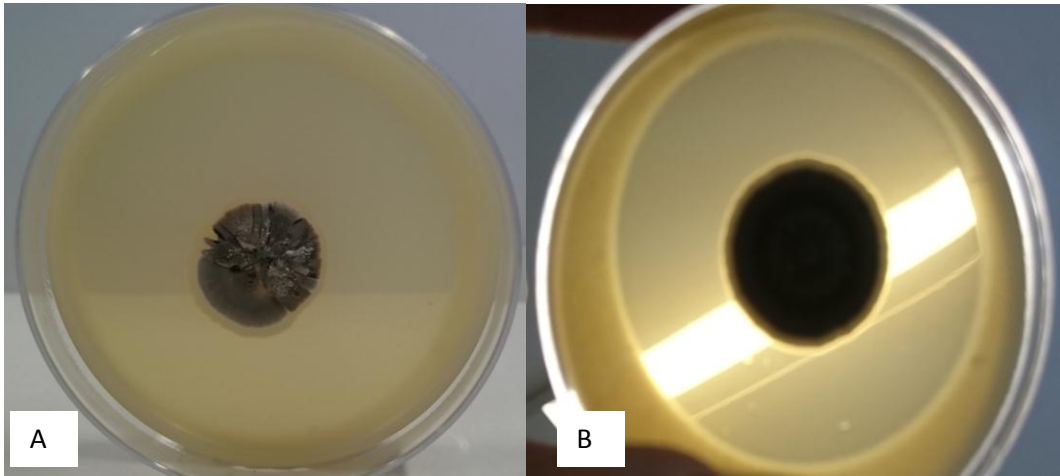


Figura 14. Hidrolise de leite realizadas por linhagens de *Streptomyces* sp. (A) IBSBF 2431; (B) IBSBF 2397.

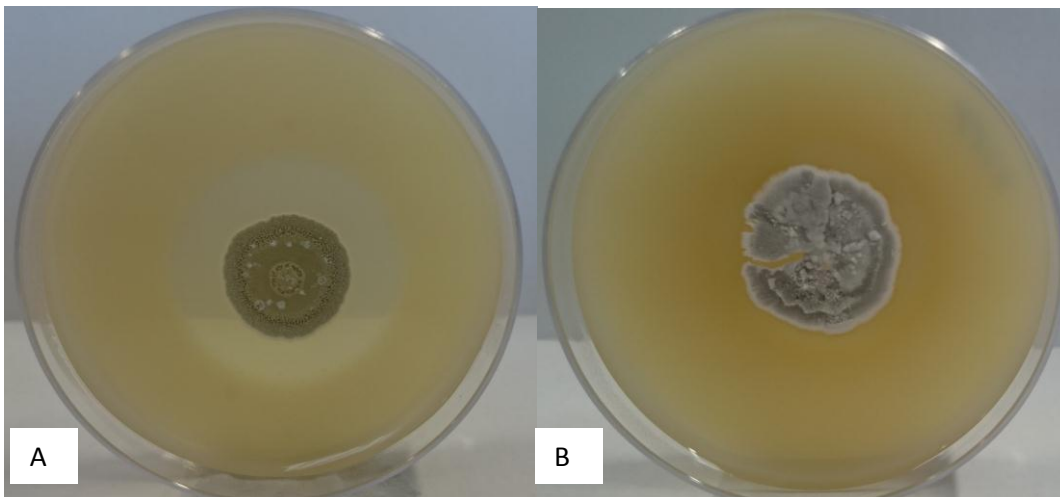


Figura 15. Hidrolise e ausência de hidrólise de leite. (A) *S. caviscabies* IBSBF 2021; (B) *S. scabiei* IBSBF 2257.

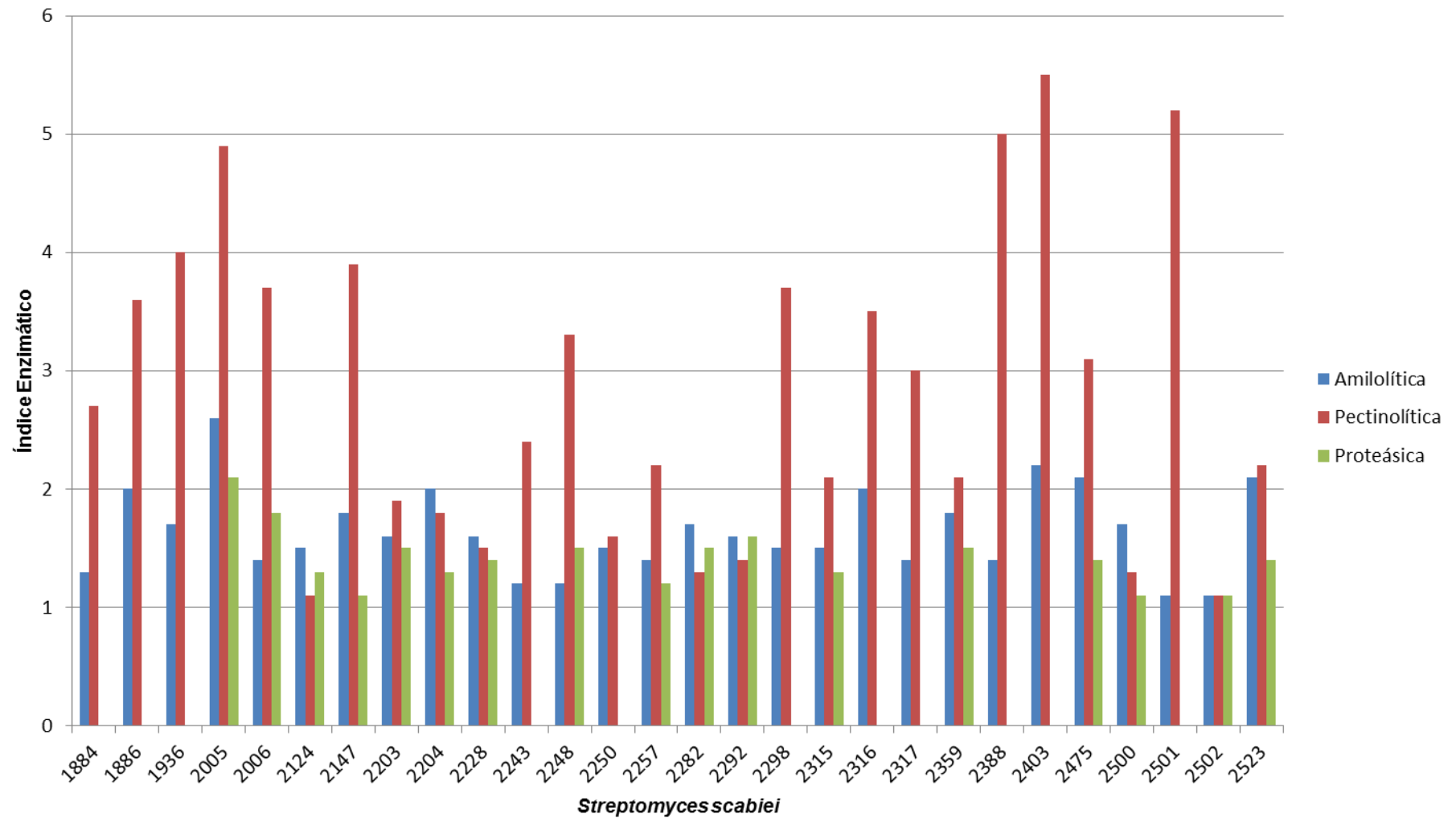


Figura 16. Índice Enzimático de amilase, pectinase e protease obtido de linhagens de *S. scabiei* por meio do cálculo de IE (raio do halo de degradação do substrato/ diâmetro médio da colônia medido perpendicularmente).

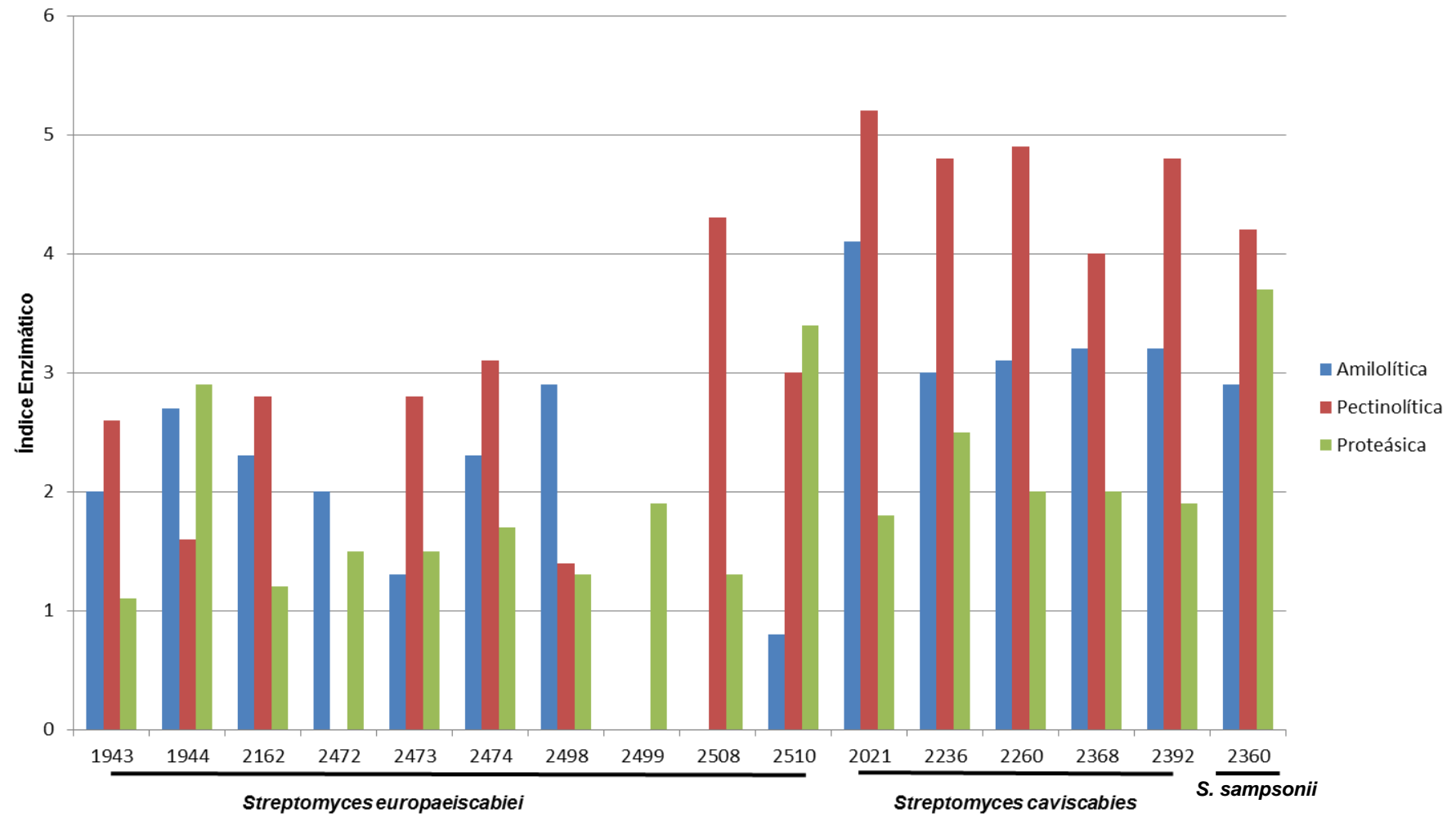


Figura 17. Índice Enzimático de amilase, pectinase e protease das linhagens de *Streptomyces europaeiscabiei*, *S. caviscabies* e *S. sampsonii* por meio do cálculo de IE (raio do halo de degradação do substrato/ diâmetro médio da colônia medido perpendicularmente).

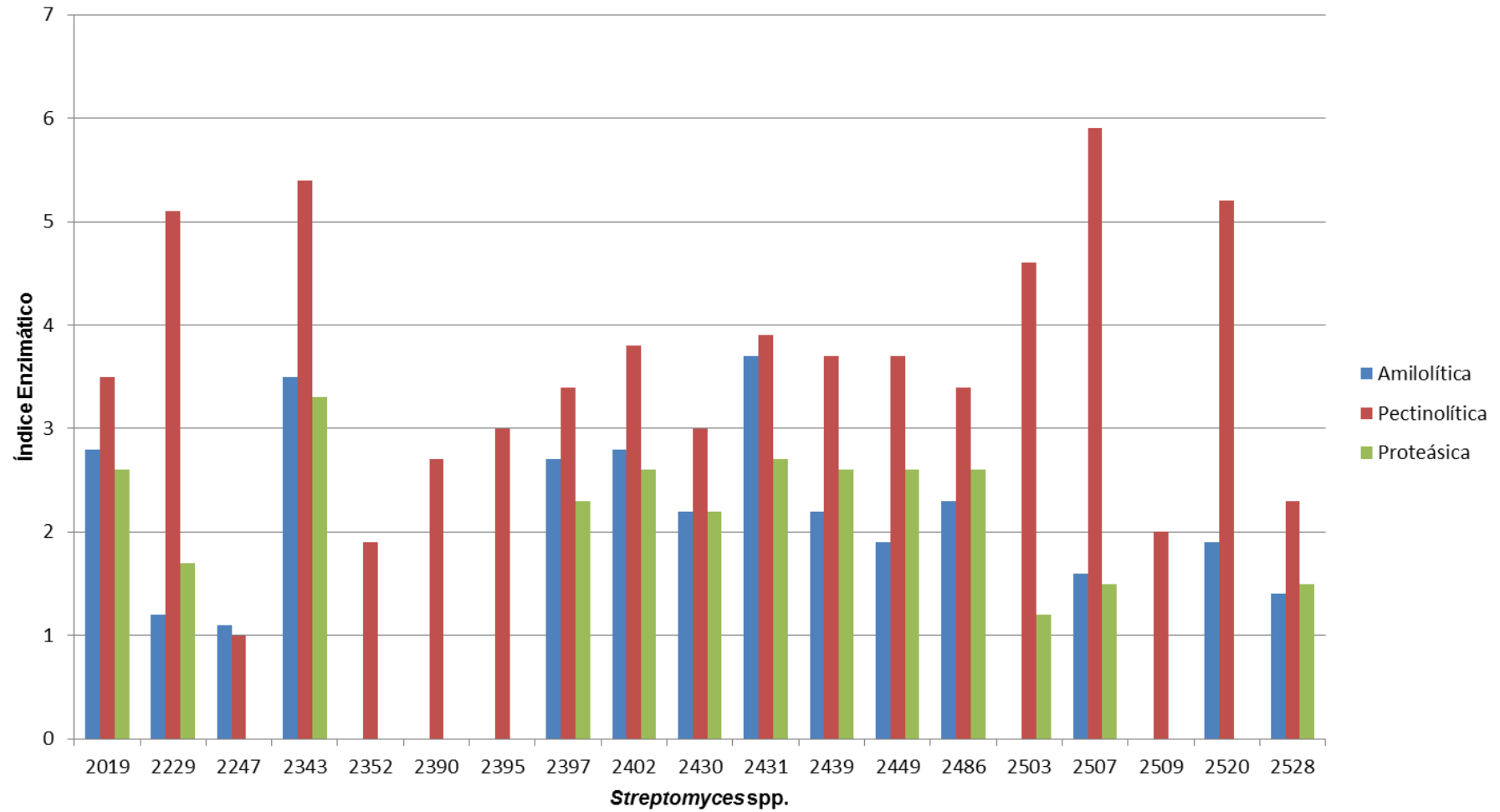


Figura 18. Índice Enzimático de amilase, pectinase e protease das linhagens de *Streptomyces* spp. por meio do cálculo de IE (raio do halo de degradação do substrato/diâmetro médio da colônia medido perpendicularmente).

Das 65 linhagens analisadas, apenas seis não apresentaram halo de degradação para amido e dentre as produtoras, somente a linhagem de *Streptomyces europaeiscabiei* (IBSBF 2510) apresentou índice enzimático inferior a 1,0. A maioria das linhagens, total de 40, apresentaram índices enzimáticos entre 1,0 e 2,0, enquanto que 18 linhagens apresentaram $IE \geq 2,1$, indicando que essas bactérias apresentam alta atividade dessa enzima. Tal resultado pode estar relacionado com o fato de que as linhagens testadas foram obtidas a partir de amostras de batata, considerada fonte vegetal que mais se destaca no armazenamento de amido (LOTTERMAN, 2012).

O amido é o principal responsável pela obtenção de energia por micro-organismos porque atua como fonte de carbono durante o crescimento/esporulação (RABALHO, 2002; MARCHI, et al., 2006). Couto e colaboradores (2002) encontraram correlação positiva entre a atividade amilolítica e o tamanho das lesões causadas pelos isolados de *Colletotrichum musae* em banana. Todas as linhagens de *S. caviscabies*, responsáveis por causar lesões profundas nos tubérculos de batata, apresentaram altos índices enzimáticos ($\geq 4,0$) neste teste com relação às demais linhagens. Apenas duas linhagens de *Streptomyces* sp., IBSBF 2343 e IBSBF 2431, exibiram IE superior a 3,0.

Nos experimentos de degradação de pectina, das 65 linhagens testadas apenas duas não apresentaram halo de degradação, ambas pertencentes à espécie *Streptomyces europaeiscabiei* (IBSBF 2472 e 2499). Ainda, 35 linhagens apresentaram $IE \geq 3,0$ podendo chegar a 5,9 no caso da linhagem de *Streptomyces* sp. IBSBF 2507. Vinte e oito 28 linhagens apresentaram IE entre 1,0 e 2,9. Segundo Marchi e colaboradores (2006), as enzimas pectinolíticas ou pectinases são consideradas importantes fatores de virulência e/ou agressividade, sendo assim alvo de inúmeras pesquisas. As pectinases atuam na degradação da lamela média, e representam o único grupo capaz de levar a maceração do tecido celular de plantas.

Embora as linhagens de *S. caviscabies* apresentem sintomas de sarna profunda e IE com valores considerados altos, essas não diferem de linhagens de *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. sampsonii* associados à sarna comum da batata, com relação ao mecanismo de entrada no hospedeiro: o patógeno invade as lenticelas na superfície do tubérculo ou qualquer outra abertura/ferimento e colonizam inicialmente os espaços intercelulares e depois intracelulares (ADAMS; LAPWOOD, 1978). Deste modo os resultados obtidos através do IE em relação à produção de pectinase desses patógenos podem estar relacionados à agressividade da doença e virulência do agente causal.

Testes realizados por Babaloba (2010) com enzimas pectinolíticas de *Fusarium compactum*, causador de doença de planta daninha que afeta o tomateiro, mostraram que o grau de infecção causado pelo fungo contra essa erva foi maior na presença de pectina do que sem a presença da mesma. De acordo com Bailey e colaboradores (1992), as enzimas

que degradam polímeros de pectina atuam no estabelecimento das infecções de espécies de *Colletotrichum* e maceração dos tecidos.

Com relação aos testes para atividade enzimática de proteases, apenas três linhagens apresentaram IE maiores que 3,0 e menores que 4,0: *Streptomyces europaeiscabiei* (IBSBF 2510), *Streptomyces sampsonii* (IBSBF 2360) e *Streptomyces* sp. (IBSBF 2343). Dezesete linhagens não apresentaram halo de degradação e as demais linhagens apresentaram IE inferiores a 2,9. Em estudos realizados por Rodrigues (2009), o IE encontrado para protease por não ultrapassou 1,6. Segundo os autores, esse fato pode estar associado ao meio de cultivo utilizado em seu estudo, além da temperatura ideal para o crescimento dos isolados de actinomicetos utilizados, que é um fator determinante para excreção de proteases. Em outro estudo Fedatto (2004) relatou dificuldades na detecção dessa enzima devido às baixas concentrações da mesma nos ensaios. Esses dois trabalhos concluem que os índices enzimáticos podem ser melhorados variando-se as condições de cultivo, pH, temperatura, tempo de incubação, etc; e nesse sentido, os resultados obtidos no nosso estudo podem ser, ainda, mais otimizados.

Melo e colaboradores (2015) realizaram estudos com *Bacillus licheniformis* para produção de protease em temperaturas que variaram de 28 a 50 °C e obtiveram resultados considerados satisfatórios quando os isolados foram cultivados a 37 °C. Resultados semelhantes foram obtidos por Duarte e colaboradores (2009) em estudos realizados com actinomicetos isolados do solo. Foram testadas temperaturas entre 25 a 45 °C e os melhores resultados foram observados a 45°C, proporcionando o aumento do halo de degradação e aumento do número de isolados positivos.

6. CONCLUSÕES

- Todas as linhagens apresentaram o gene PKS-II, porém a presença para os genes PKS-I e NRPS foi variável; todas as linhagens pertencentes à *S. caviscabies* apresentaram presença de todos os genes;
- Nos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* frente às bactérias de importância clínica, a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (isolado de porco), *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) foi verificada por 20, 14, 3 e 14 linhagens de *Streptomyces* spp., respectivamente;
- Somente as linhagens de *Streptomyces* sp. IBSBF 2019 e 2397 apresentaram atividade antimicrobiana frente às quatro bactérias indicadoras testadas;
- 59 linhagens de *Streptomyces* spp. apresentaram halos de degradação de amido, 63 para pectina e 48 para o leite desnatado, com índices enzimáticos $\geq 1,0$;
- Os maiores índices enzimáticos foram observados para degradação de pectina, onde as linhagens pertencentes à espécie *Streptomyces caviscabies*, associadas à sarna profunda apresentaram valores entre 4,0 e 5,2. O maior valor encontrado foi de 5,9 registrado pela linhagem de *Streptomyces* sp. IBSBF 2507.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. J.; LAPWOOD, D. H. Studies on the lenticels development, surface microflora and infection by common scab (*Streptomyces scabies*) of potato tubers growing in wet and dry soils. **Annals of Applied Biology**, v. 90, p. 335-343, 1978.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**, 4th ed. Academic Press, San Diego, 1997

ALANI, F.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. New isolate of *Streptomyces* sp. With novel thermoalkalotolerant cellulases. **Biotechnol Letters**, v. 30, p. 123-126, 2008.

ALBERTON, L. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; ASSMAN, R.; MÜNCHEN, L.; CIFFONI, E. M. G.; PACHALY, J. R.; SOCCOL, C. R. Efeito do extrato bruto enzimático de *Streptomyces viridosporus* T7A sobre a digestibilidade de matéria seca *in vitro* para ruminantes. UNIPAR, Umuarama. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia**, v. 9 n. 1, p. 29-36, 2006.

ANTUNES, T. C. Avaliação de moléculas Bioativas produzidas por isolados actinomicetos contra cocos gram positivos de origem clínica. Dissertação (Mestrado em Microbiologia do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013. 97p.

ARIJIT, D.; SOURAV, B.; NAIMISHA, R.; RAJAN, S. Improved production and purification of pectinase from *Streptomyces* sp. GHBA10 isolated from Valapattanam mangrove habitat, Kerala, India. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 3, p. 16-22, March, 2013.

AYUSO-SACIDO A.; GENILLOUD, O. New PCR *primers* for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. **Microbial Ecology**, v. 49, p. 10-24, 2005.

BABALOLA, O. O. Pectinolytic and Cellulolytic Enzymes Enhance *Fusarium compactum* Virulence on Tubercles Infection of Egyptian Broomrape. **International Journal of Microbiology**, 2010. 7p. (doi:10.1155/2010/273264).

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

BALTZ, H. Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1533-1540, 2006.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, **Brasil. Evidência**, Joaçaba, v. 11 n.2, p. 15-28, 2011.

BARRETO, E. N. Potencial antimicrobiano de actinobactérias e detecção dos genes associados às vias de NRPS e PKS-I. Mestrado (Dissertação). Biotecnologia Industrial. Universidade Tiradentes, Aracajú, SE, 2013. 48p.

BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. **Jornal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.24, p. 306-402, 2000.

BELFAQUIH, N.; PENNINGCKX, M. J. A bifunctional β -xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 114-121, 2000.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances** v. 18, p. 355-383, 2000.

BIRSCHBACH, P.; FISH, N.; HENDERSON, W. WILLRETT, D. Enzymes: tools for creating healthier and safer food. **Food Technology**, v. 58, p. 20-28, 2004.

BISPO, A. S. R. Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no Estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2010. 104p.

BÖCKLE, B.; GALUNSKY, B.; MÜLLER, R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DMS 40530. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3705-3710, 1995.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], Rio de Janeiro, 2008.

BORBA, M. P. Avaliação das condições ideais de crescimento para *Streptomyces* sp. – visando potencial antimicrobiano. TCC (Conclusão de Curso) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013. 28p.

BOUCHEK-MECHICHE, K.; GARDAN, L.; NORMAND, P.; JOUAN, B. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new

species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 91-99, 2000.

BUSTI, E.; MONCIARDINI, P.; CAVALETTI, L.; BAMONTE, R.; LAZZARINI, A.; MARGHERITA SOSIO, M.; DONADIO, S. Antibiotic – producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. **Microbiology**, v.152, p. 675-683, 2006.

CARVALHO, T. S. Avaliação da Atividade Antibacteriana do Actinomiceto Endofítico R18(6) Contra Bactérias Gram-Negativas Multirresistentes. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Ambiental). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014. 90p.

CHELLAPANDI, P.; JANI, H. M. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p. 122-127, 2008.

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

CLARDY, J.; WALSH, C. T. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.

COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção**, p.71-94, 2008.

COLIN, V. L.; PEREIRA, C. E.; VILLEGAS, L. B.; AMOROSO, M. J.; ABATE, C. M. Production and partial characterization of biomulsifier from chromium-resistant actinobactéria, v. 9, n. 4, p. 1372-1378, 2002.

COLLADO, I. G.; SÁNCHEZ, A. J. M.; HANSON, J. R. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the controlo f the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Natural Production Reports**, v. 24, p. 674-686, 2007.

COMPARONI, R. Caracterização da diversidade genética de linhagens de *Streptomyces scabiei* e avaliação do potencial antagônico de micro-organismos no controle da sarna da batata. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). IB/SP/Campinas. 2015. 65p.

- CONTI, R. Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biossintético. Tese (Doutorado Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. 2012. 271p.
- CORRÊA, D. B. A. Caracterização de novas espécies de *Streptomyces* associadas a sarna da batata no Brasil. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Campinas. 2015. 160p
- CORRÊA, D. B. A. Caracterização morfológica, patogênica e molecular de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata de diferentes regiões produtoras do Brasil. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas. 2011. 168p. Disponível em:
<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000788896>
- CORRÊA, F. A. F. Características dos patótipos de *E. coli* e implicações de *E. coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos. Seminário de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (Mestrado), 2012. 37p.
- CORTALET, M.; NEGOITA, T. GH.; BAHRIM, G. E.; STOUGAARD, P. Partial characterization of cold active amylase and proteases of *Streptomyces* sp. from Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 868-877, 2011.
- COUTO, E. F.; MENEZES, M.; COELHO, R. S. B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação de isolados de *Colletotrichum musae*. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 260-266, 2002.
- CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. (eds): Anticancer agents from natural products. Taylor & Francis; 2005.
- CROSA J. H., WALSH C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 223–249, 2002.
- CRUZ, P. L. R.; GIAROLA, L. R.; MORAES, S. S.; SILVA, D. E. S. G.; MARCON, J. AZEVEDO,; K. L. ARAÚJO, W. L.; OLIVEIRA, L. G. Triagem Metabólica por PKS e NRPS em actinobactérias endofíticas de *Citrus reticulata*. **Quimica Nova**, v. 38, n. 3, p. 333-341, 2015.

DA-CRUZ, Mapeamento do Potencial Biossintético em linhagens de *Streptomyces*.
Dissertação de Mestrado em Química. UNICAMP, 2011. 149p.

DA-SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, Hemicelulases e Celulases,
ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Sociedade Brasileira
de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology.
Molecular Biotechnology, v.38, p. 41-45, 2008.

DOW, J. M.; CLARKE, B. R.; MILLIGAN, D. E.; TANG, J. L.; DANIELS, M. J. Extracellular
proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. **Applied
Environmental Microbiology**, v. 50, n.10, p. 2994, 1990.

DUARTE, M. W.; DAMASCENO, R. G.; SALAMONI, S. P.; OLIVEIRA, M. F.; SAND, S. T. V.
D. Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos
isolados de solo. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas. Universidade
Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). 2009. 33p.

EMBRAPA. Alerta Helicoverpa, disponível em: <https://www.embrapa.br/alerta-helicoverpa>,
último acesso: 15/05/2016.

EMBLEY, T. M.; STACKEBRANT, E. The molecular phylogeny and systematics of the
actinomicetes. **Annual Review Microbiology**, v. 48, p. 257-289, 1984.

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

EVANGELISTA-MARTÍNEZ, Z.; MORENO-ENRÍQUEZ, A. Metabolitos secundários de
importância farmacêutica produzidos por actinomicetos. **BioTecnología**, v. 11, n. 3, 2007.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus
aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320,
2004.

FAUCHER, E.; OTRYSCO, B.; PARADIS, E.; HODGE, N. C.; STALL, R. E.; BEAULIEU, C.
Characterization of *Streptomyces* causing russet scab in Quebec. **Plant Disease**, v. 77, p.
1217-1220, 1993.

FEDATTO, L. M. Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas). ESALQ/CENA-USP. Piracicaba, 2004. 70p.

FISHBACH, M. A.; WALSH, C. T.; CLARDY, J. The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, p. 4601-4608, 2008.

FISHER, I. H.; KIMATI, H.; MARTINS, M. C. Isolamento, Caracterização Cultural-Morfológica, Patogenicidade e Serologia de *Streptomyces* spp. da Batata. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 650-655, 2003.

FLORES, M. E.; PÉREZ, R.; HUITRÓN, C. β -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 410-416, 1997.

FRANCO, R. M. *Escherichia coli*: Ocorrência em suínos abatidos na grande rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana. Universidade Federal Fluminense, Pós-Graduação em Medicina Veterinária, , 2002.

FREEDONIA - The Freedonia Group Incorporated, 2005. **Word Enzymes to 2009**. Disponível em: <http://www.freedoniagroup.com/pdf/1949smwe.pdf> Acessado em: 18 de setembro de 2014.

FREEDONIA- The Freedonia Group Incorporated, 2009. **World Enzymes to 2013**. Disponível em: <http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html>. Acessado em: 18 de setembro de 2014

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRÄF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 470-473, 2008.

GHORBEL, S.; KAMMOUN, M.; SOLTANA, H.; NASRI, M.; HMIDET, N. *Streptomyces flavogriseus* HS1: Isolation and characterization of extracellular proteases and their compatibility with laundry detergents. **BioMed Research International**, p. 8, 2014.

GINOLHAC A, JARRIN C, GILLET B, ROBE P, PUJIC P, TUPHILE K, BERTRAND H, VOGEL TM, PERRIERE G, SIMONET P, NALIN R. Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5522–5527, 2004.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. 2nd Edition, 2007.

GOPALAKRISHNAN, S.; RAJENDRAN, V.; ARUMUGAM, S.; SHARMA, H. C.; VLADAMUDI, S.; BHIMINENI, R. K.; GONZALEZ, S. V.; MELO, T. M.; SIMIC, N. Insecticidal activity of a novel fatty acid amide derivate from *Streptomyces* species against *Helicoverpa armigera*. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, 2016.

GOYER, C.; FAUCHER, E.; BEAULIEU, C. *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from Deep-Pitted lesions in Potatoes in Québec, Canada. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 635-639, July, 1996.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. da S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial byproducts and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272–277, 2005.

GUPTA, R.; SAXENA, R. K.; CHATURVEDI, P.; VIRDI, J. S. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. **Journal Applied Bacteriology**, v. 78, p. 378-383, 1995.

HANKIN L, ZUCKER M, SANDS D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied of Microbiology**, v. 22, p. 205-209, 1971.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Micologia**, v.67, p.597-607, 1975.

HAO, J. J.; MENG, Q. X.; YIN, J. F.; KIRK, W. W. Characterization of a new *Streptomyces* strain, DS3024, that causes potato commom scab. **Plant Disease**, v. 93, n. 12, p. 213-221, 2009.

HERLACHE, T. C.; HOTCHKISS JR, A. T.; BURR, T. J.; COLLMER, A. Characterization of the *Agrobacterium vitis* *pehA* gene and comparison of the encoded polygalacturonase with the homologus enzymes from *Erwinia carotovora* and *Ralstonia solanacearum*. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 338, 1997.

HOLT, R. T.; KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. Ed. Baltimore: Williams & Wikins, 1994.

HOOKER, W. J. Common scab. In: Compendium of Potato Diseases. W. J. Hooker ed. **American Phytopathological Society**. St. Paul MN. v. 125 p. 33-34, 1981.

HOPWOOD, D. A. Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. How natural selection drives chemical innovation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.105, p. 4601-4608, 2008.

HU, N. T.; HUNG, M. N.; CHIOU, S. J.; TANG, F.; CHIANG, D. C.; HUANG, H. Y.; WU, C. Y. Cloning and characterization of gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 8, p. 2679, 1992.

HUANG, Q.; ALLEN, C. An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, *pehB*, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 23, p. 7369-7368, 1997.

HUANG, X.; ZHAI J.; LUO. Y.; RUDOLPH, K. Identification of a highly virulent strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, p. 461-469, 2008.

INDRAKUMAR, K. D. J. Characterization of *Streptomyces* sp., and its utilization in fishery industry. **International Journal of Geological Sciences**, v. 1, n. 2, 2014.

JANARDHAN, A.; KUMAR, A. P.; VISWANATH, B.; SAIGOPAL, D. V. R.; NARASIMHA, G. Production of bioactive Compounds by Actinomycetes and their antioxidant properties. **Biotechnology Research International**, p. 8, 2014.

JANG, H.-D.; CHEN, K.-S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 263-268, 2003.

JANSO, J. E.; CARTER, G. T. Biosynthetic Potential of Phylogenetically Unique Endophytic Actinomycetes from Tropical Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 76, p. 4377-4386, 2010.

JAYASREE, D.; KUMARI, T. D. S.; KISHOR, P. B. K.; LAKSHMI, M. V.; NARASU, M. L. Optimization of production protocol of alkaline protease by *Streptomyces pulvereceus*. **International Journal of Environment Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 79-82, 2009.

JENKE-KODAMA, H; DITTMANN, E. Evolution of metabolic diversity: Insights from microbial polyketide synthases. **Phytochemistry**, New York, v. 70, p. 1858-1866, 2009.

JEON, B. J.; KIM, J. D.; HAN, J. W.; KIM, B. S. Antifungal activity of rimocidin and a new rimocidin derivate BU16 produced by *Streptomyces mauvecolor* BU16 and their effects on pepper anthracnose. **Journal of Applied Microbiology**, 2016.

KIMURA, G. K. Investigação do Potencial Celulolítico de Bactérias Oriundas de Processos de Compostagem. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas. 2014. 84p.

KIMURA, M. A. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KANNAN, R. R.; INIYAN, A. M.; VICENT, S. G. P. Production of a compound against methicilium resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from *Streptomyces rubrolavendulae* ICN3 & its evaluation in zebrafish embryos. **Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. 6, p. 913-920.

KLEINKAUF H, VON DÖHREN H. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. **European Journal of Biochemistry**, p. 192:1-15, 1990.

KURTBÖKE, D. I.; SWINGS, J.; STORMS, V. Microbial genetic resources and Biodiscovery. In Ipek Kurtböke & Jean Swings (eds), **Microbial Genetic Resources and Biodiscovery WFCC Publications**, 2004.

LABEDA, D. P.; LYONS, A. J. DNA relatedness among strains of the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoea* (Person and Martin 1940) Waksman and Henrici 1948. **Applied in Environment Microbiology**, v. 58, p. 532-535, 1992.

LADJAMA, A.; TAIBI, Z.; MEDDOUR, A. Production of pectinolytic enzymes using *Streptomyces* strains isolated from palm grove soil in Biskra area (Algeria). **African Crop Science Conference Proceedings**, v. 8, p. 1155-1158, 2007.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* celulase production using agro-industrial by-products and its potencial use in the detergente and têxtil industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272-277, 2005.

LIN, Y.-S.; KIESER, H. M.; HOPWOOD, D. A.; CHEN, C. W. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. **Molecular Microbiology**, v. 10, p. 923-933, 1993.

LIU, Z.; SHI, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, Z. O.; LU, Z.; LI, W.; HUANG, Y.; RODRIGUEZ, C.; GOODFELLOW, M. Classification of *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948 and related species and the transfer of '*Microstreptospora cinerea*' to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 55: 1605-1610, 2005.

LPSN (List of prokaryotic names with standing in nomenclature internet) Última atualização: Junho, 2013. Disponível em: <http://www.bacterio.net/>. Acesso: 20 de setembro de 2015.

LUO, L.; CAI, J.; WANG, C.; LIN, J.; DU, X.; ZHOU, A.; XIANG, M. Purification and characterization of an alkaliphilic endo-xylanase from *Streptomyces althioticus* LMZM and utilization in the pulp paper industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, p. 1093-1098, 2016.

HOPWOOD, D. A. Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 2465-2497, 1997.

LIVERMORE, D. M. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare?. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 634-40, 2002.

LAMBERT, D.H.; LORIA, R. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 387–392, 1989.

LAMBERT, D.H.; LORIA, R. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. . **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 393–396, 1989.

LORIA, R.; BUKHALID, R. A.; FRY, B. A.; KING, R. R. Plant pathogenicity in the Genus *Streptomyces*. **Plant Disease**, v. 81, n. 8, p. 836-846, 1997.

LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 469-487, 2006.

LOTTERMANN, M. T. Purificação e Caracterização Estrutural de uma α -amilase de *Cryptococcus flavus* expressa em *Shaccharomyces cerevisiae* "MFL". Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília. 2012. 92p.

LYND, R.L.; WEIMER, J. P.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MANN, M.; WILSON, P.; DAVIES, J.K.; LEADLAY, P.F.; STINEAR, T.P. Deciphering the genetic. Natural products as immunosuppressive agents. **Natural Products Report**, v. 18, p. 417-430, 2001.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; MIZUBUTI, E. S. T. Atividades amilolíticas e pectinolíticas de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathologyc**, v. 32, n. 4, p. 345-352, 2006.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ALVARADO, I. DEL C.; M.; SILVA, A. M. F. Bactérias Fitopatogênicas Pectinolíticas dos Gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 2, p. 121-153, 2005.

MELO, F. M .P. Bioprospecção de Actinobactérias rizoféricas de milho (*Zea mays* L.) com atividade antifúngica. Tese de Doutorado. Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. São Paulo, 2009. 105p.

MELO, I. S. A importância da celulase na degradação de matéria orgânica. *In*: Frighetto RTS & Valarini PJ. Indicadores Biológicos e Bioquímicos da Qualidade do Solo: Manual Técnico. **Embrapa Meio Ambiente**, p. 89-98, 2000.

MELO, V. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SILVA, C. A. A. Produção de protease utilizando diferentes meios através de amostrar de *Bacillus licheniformis* isoladas do porto da cidade de Recife- Pernambuco. **E-xacta**. v. 8, n.1, p. 57-65, 2015.

MENDES, R. A.; COELHO, A. I. M.; AZEREDO, R. M. C. Contaminação por *Bacillus cereus* em superfícies de equipamentos e utensílios em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 9, p. 3933-3938, 2011.

METSÄ-KETELÄ, M., SALO, V., HALO, L., HAUTALA, A., HAKALA, J., MANTSALA, P., YLIHONKO, K. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 1-6, 1999.

MILLARD, W. A.; BURR, S. A study of twenty-four strains of *Actinomyces* and their relation to types of common scab of potato. **Annals of Applied Biology**, v. 13, p. 580-644, 1926.

- MIYADOH, S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. **Actinomycetologia**, v.9, p. 100-106, 1993.
- MIYAJIMA, K.; TANAKA, F., TAKEUCHI, T.; KUNINAGA, S. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 495-502, 1998.
- MOFFITT, M. C.; NEILAN B. A. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. **Journal of Molecular Evolution**, v. 56, p. 446–457, 2003.
- MORAES, L. M. P.; ASTOLFI-FILHO, S.; OLIVER, S. G. Development of yeast strains for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs that express α -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1067-1076, 1995.
- NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R.; MARQUES, S., ALVES, L., GÍRIO, F. M., BON, E. P. S.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 549-555, 2002.
- NASCIMENTO, R. P.; JUNIOR, N. A.; PEREIRA JR. N.; BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 529-535, 2009.
- NEVES, M. C. P.; GAVA, C. A. T. Actinomicetos no solo. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa MG, 2008.
- NICHOLSON, T. P., DAWSON, M., LAZARUS, C. M., SIMPSON, T. J.; COX, R. J. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. **Chemistry Biology**, v. 8, p. 157–178, 2001.
- NOGUEIRA, P. S. F.; MOURA, E. R. F.; COSTA, M. M. F.; MONTEIRO, W. M. S.; BRONDI, L. Perfil da Infecção Hospitalar em um Hospital Universitário. **Revista de Enfermagem**, UERJ, v. 17, n.1, p. 96-101, 2009.
- OLIVEIRA, C. Condensação de Claisen e Dieckmann. Universidade Federal de Pernambuco, Pós-Graduação em Química. Recife, 2007.
- PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa CNPMA, p. 327-343, 1998.

PANDEY, A.; WEBVB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology Ind ed. New Delhi: asiotech Publishers, p. 760, 2005.

PARK, D. H.; KIM, J. S.; KWON, S. W.; WILSON, C.; YU, Y. M.; HUR, J. H.; LIM, C. K. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 2049-2054, 2003.

PERSON, L. H.; MARTIN W. J. Soil rot of sweet potatoes in Louisiana. **Phytopathology**, v. 30, p. 913-926, 1940.

PIDOT, S. J.; HONG, H.; SEEMANN, T.; PORTER, J. L.; YIP, M. J.; MEN, A.; JOHNSON, M.; WILSON, P. DAVIES, J. K.; LEADLAY, P. F.; STINEAR, T. P. Deciphering the genetic basis for polyketide variation among mycobacteria producing mycolactones. **BMC Genomics**, v.9, p 462, 2008.

PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J., Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters Applied of Microbiology**, v. 8, p. 151-156, 1989.

PROCÓPIO, R. E. L.; DA-SILVA, I, R.; MARTINS, M. K.; DE-AZEVEDO, J. L.; DE-ARAÚJO, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466-471, 2012.

QIN, S.; LI, J.; CHEN, H-H.; ZHAO, G-Z.; ZHU, W-Y.; JIANG, C-L.; XU, L-H.; LI, W-J. Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6176-6186, 2009.

RABALHO, A. A. Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido da mandioca. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual Paulista, 2002. 184p.

RASHAD, F. M.; FATHY, H. M.; EL-ZAYAT, A. S.; ELGHONAIMY, A. M. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. **Microbial Research**, v. 175, p. 34-47, 2015.

RATTI, R. P. Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por *Streptomyces tubercidius*, endofítico isolado de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) do Cerrado de São Carlos- SP. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Carlos. 2009. 113p.

RAVIKUMAR S.; FREDIMOSSES M.; GNANADESIGAN, M. Anticancer property of sediment actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 92-96, 2012.

RODRIGUES, A. A. Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Goiás. 2009. 80p.

ROMERO, F. J. et al., Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grow in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 507-515, 2001.

RONG, X.; DOROGHAZI, J. R.; CHENG, K.; ZHANG, L.; BUCKLEY, D. H.; HUANG, Y. Classification of *Streptomyces* phylogroup pratensis (Doroghazi and Buckley, 2010) based on genetic and phenotypic evidence, and proposal of *Streptomyces pratensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 401-407, 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987

SALOMONI, S. P. Avaliação da atividade microbiana de isolados de *Streptomyces* e estudo da produção de moléculas bioativas. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009. 151p.

SANTOS, E. R.; TELES, Z. N. S.; CAMPOS, N. M.; SOUZA, D. A. J.; BISPO, A. S. R.; NASCIMENTO, R. P. Production of α -Amylase from *Streptomyces* sp. SLBA-08 Strain Using Agro-Industrial By-Products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 793-800, 2012.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRILICH, G. D.; COSTERTON, W.; DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1140-1154, 2002.

SCHIRMER, A.; GADKARI, R.; REEVES, C. D.; IBRAHIM, F.; DELONG, E. F.; HUTCHINSON, C. R. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene

clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*.

Applied of Environment Microbiology, v. 71, p. 4840–4849, 2005.

SEMÊDO, L. T. A. S.; GOMES, R. C.; LINHARES, A. A.; DUARTE, G. F.; NASCIMENTO, R. P.; ROSADO, A. S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R.; SILVA, K. R. A.; ALVIANO, C. S.; MANFIO, G. P.; SOARES, R. M. A.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. **International Journal of Systematic Evolutionary and Microbiology**, v. 54, p. 1323–1328, 2004.

SIERRA, G. A. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts.

Antonine van Leeuwenhoeck, v. 28, p.15-22, 1975.

SILVA, A. L. S. Otimização do processo fermentativo para produção do antibiótico nigericina por *Streptomyce*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo (USP), 2014. 102p.

SLACK, S. A. A look at potato leafroll virus and potato virus Y: Past, present and future.

Badger Common Tater, v. 43, p. 16-21, 1991.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.

STAMFORD, T. L.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados de jacatupé (*Pachyrhizus erosos* L. Urban). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.18, n. 4, p. 382- 385, 1998.

STOVER, C. K.; X. Q. PHAM, A. L.; ERWIN, S. D.; MIZOGUCHI, P.; WARRENER, M. J.; HICKEY, F.S. L.; BRINKMAN, W. O.; HUFNAGLE, D. J.; KOWALIK, M.; LAGROU, R. L.; GARBER, L.; GOLTRY, E.; TOLENTINO, S.; WESTBROCK-WADMAN, Y.; YUAN, L. L.; BRODY, S. N.; COULTER, K. R.; FOLGER, A.; KAS, K.; LARBIG, R.; LIM, K.; SMITH, D.; SPENCER, G. K.-S.; WONG, Z.; WU, I. T.; PAULSENK, J.; REIZER, M. H.; SAIER, R. E. W.; HANCOCK, S.; LORY & M. V. OLSON. Complete genome sequence os *Pseudomonas aeruginosa* PA01, na opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, 2000.

STUZENBERGER, F. J.; BODINE, A. B. Thermostable beta-Xylosidase from *Thermomonospora curvata*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 55-60, 1998.

- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.
- TANG, J. L.; LIU, Y. N.; BARBER, C. E.; DOW, J. M.; WOOTTON, J. C.; DANIELS, M. J. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 226, p. 409-417, 1991.
- TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 777-780, 1982.
- TEMUJIN, U.; KIM, J.-W.; KIM, J.-K.; LEE, B.-M.; KANG, H.-W. Identification of a novel pathogenicity-related cellulases genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 76, p. 152-157, 2011.
- VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n.1, p. 159-163. 2004.
- VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K.F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.
- VIEIRA, J. D. G. Purificação e caracterização de uma α -amilase de *Streptomyces* sp. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 1999. 86p.
- VILLAS BÔAS, P. J. F.; RUIZ, T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, v. 3, p. 372-8. 2004.
- VYAS, A.; VYAS, D.; VYAS, K. M. Microbial cellulases for industrial application. **Everyman's Science**, v. 40, n. 6, p. 411-416, 2006.
- WANG, H.; SIVONEN, K.; FEWER, D. P. Genomic insights into the distribution, genetic diversity and evolution of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 35, p. 39-85, 2015.
- WANNER, L. A. A new strain of *Streptomyces* causing common scab in potato. **Plant Disease**, v. 91, p. 352-359, 2007.

WANNER, L. A.; KIRK, W. W.; QU, X. S. Field efficacy of nonpathogenic *Streptomyces* species against potato common scab. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 123-133, 2014.

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

ZENG, Q.; HUANG, H.; ZHU, J.; FANG, Z.; SUN, Q.; BAO, S. A new nematocidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 5, p. 1107-1111, 2013.

ZHAO, Q.; HE, Q.; DING, W.; TANG, M.; Kang, Q.; Yu, Y.; Deng, W.; Zhang, Q.; Fang, J.; Tang, G.; Liu, W. Characterization of the Azinomycin B Biosynthetic Gene Cluster Revealing a Different Iterative Type I Polyketide Synthase for Naphthoate **Biosynthesis. Chemistry and Biology**, v. 15, p. 693–705, 2008.

ANEXO 1

Meios de cultivo utilizados neste estudo

1) YME – *Yeast Malt Extract*

Extrato de levedo	4 g
Extrato de Malte	10 g
Glucose	4 g
Ágar	18 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
pH	7,2

2) Meio básico

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,64 g
KH_2PO_4	2,38 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5,65 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,00 g
Solução STS	1 mL
Água destilada q.s.p.	1 L
Ágar	15 g
pH	6,8 a 7,0

Solução de traços de sais (STS)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,64 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,11 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,79 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

3) **YME + Amido** – Meio YME acrescido de 2 g de amido.

4) **YME + Leite** – Meio YME acrescido de 18,80 mL de leite desnatado Molico® 20% q.s.p. 1000 mL do meio de cultivo.

APÊNDICE 1

TABELA 4. Medida do tamanho das colônias medido perpendicularmente e diâmetro do halo de degradação para detecção da atividade enzimática das linhagens de *Streptomyces* spp.

<u>Amilase</u>			<u>Protease</u>			<u>Pectinase</u>		
IBSBF	Colônia	Diâmetro	IBSBF	Colônia	Diâmetro	IBSBF	Colônia	Diâmetro
1884	2,1	2,8	1884	2,4	0	1884	1,15	3
1886	1,75	3,4	1886	1,8	0	1886	1	4
1936	2,05	3,6	1936	1,75	0	1936	1,1	5,5
1943	1,8	3,5	1943	2,2	2,5	1943	0,9	4
1944	1,6	4,2	1944	1,75	3	1944	0,65	1
1945	1,7	3,4	1945	1,95	2,7	1945	1,2	0
2005	1,3	3,8	2005	1,35	3,1	2005	0,9	4,2
2006	0,75	1	2006	1,85	3,6	2006	1,2	4,7
2019	1,4	4	2019	2	5,2	2019	1,65	5,5
2021	1	3,8	2021	1,6	2,9	2021	1,1	5,5
2124	2	3,5	2124	2	2,3	2124	1,1	1,2
2147	1,95	3,7	2147	1,9	2,1	2147	0,7	2,7
2162	1,65	3,7	2162	1,9	2,4	2162	0,8	2,2
2203	2,15	3,5	2203	2,1	3,3	2203	1	1,7
2204	1,75	3,5	2204	1,85	2,5	2204	1,2	1,9
2228	2,35	3,8	2228	2,2	3,2	2228	0,9	1,5
2229	1,55	2	2229	1,2	2,9	2229	0,7	3,5
2236	1,5	5	2236	1,65	3,7	2236	1,1	5,5
2243	2,2	2,9	2243	2,35	0	2243	1,05	2,5
2247	1,35	1,5	2247	0,9	0	2247	1,1	1,8
2248	2	3,7	2248	1,95	2,8	2248	0,75	3,3
2250	2,1	3,2	2250	2,3	0	2250	1,4	2,3
2257	2	2,7	2257	2,15	2,5	2257	1,2	2,5
2260	1,6	5,3	2260	1,6	3,5	2260	1,15	5,5
2282	2	3,4	2282	1,8	2,9	2282	1,5	2
2292	2,05	3,2	2292	2,15	3,3	2292	1,4	2
2298	2,1	3	2298	1,95	0	2298	0,6	2
2315	2,05	3	2315	2,15	2,7	2315	1,2	2
2316	1,65	2,2	2316	1,5	0	2316	0,65	2,4
2317	2,3	3,3	2317	2,25	0	2317	0,85	2,5
2343	1,35	4,7	2343	1,35	4,7	2343	1	5,5
2352	1,05	0	2352	1	0	2352	1	2
2359	2,3	4	2359	2,05	3	2360	1,3	5,5
2360	1,6	5,2	2360	1,6	5,5	2368	1,3	5,5
2368	1,5	4,9	2368	1,6	3,3	2388	1	5,5
2388	1,9	3	2388	2,3	0	2388	1,5	2

Continuação Tabela 4.

Amilase			Protease			Pectinase		
IBSBF	Colônia	Diâmetro	IBSBF	Colônia	Diâmetro	IBSBF	Colônia	Diâmetro
2390	1,35	0	2390	0,8	0	2390	0,8	2,4
2392	1,75	5,5	2392	1,9	3,7	2392	1,15	5,5
2395	1,1	0	2395	1,85	0	2395	1,45	2,8
2397	1,15	3,2	2397	2	4,9	2397	1,2	4
2402	1	3,5	2402	1,6	4,4	2402	1,5	4
2403	1,65	4	2403	2,5	0	2403	0,95	5,5
2407	2,2	2,7	2407	2,35	3,2	2407	1	2
2430	1	1,8	2430	2	4,2	2430	1,65	4,8
2431	1	3,4	2431	1,9	4,9	2431	1,4	5
2439	1,5	3,1	2439	1,7	4,5	2439	1,2	4,6
2449	2	3,4	2449	1,7	4,5	2449	1,3	5,3
2472	1,65	3,3	2472	1,9	2,7	2472	0,7	0
2473	1,6	2,2	2473	1,8	2,7	2473	0,4	2,4
2474	1,75	3,9	2474	1,75	3	2474	0,9	5,3
2475	1,65	4,1	2475	1,6	2,5	2475	0,7	2,2
2486	1,1	2,5	2486	1,75	4,7	2486	1,6	5,5
2498	1,2	3,3	2498	1,75	2,5	2498	1	1,5
2499	1,75	0	2499	2	3,2	2499	0,7	0
2500	2	4	2500	2,5	2,8	2500	1,05	1,5
2501	2	2,3	2501	1,8	0	2501	0,7	3,5
2502	1,75	2	2502	2,15	2,3	2502	1	1,1
2503	0,75	0	2503	1,15	1,5	2503	0,7	3,5
2507	2,25	2,8	2507	1,5	2,3	2507	0,8	4,3
2508	1,25	0	2508	0,95	1,2	2508	0,7	3,5
2509	0,7	0	2509	2	0	2509	1,5	3
2510	0,6	0,8	2510	1,35	4,2	2510	1	3,2
2520	1,6	3	2520	1,9	0	2520	1	5,4
2523	2	4	2523	2,15	3	2523	1,1	2,5
2528	1,7	2,5	2528	2,05	3	2528	0,65	1,9

APÊNDICE 2

TABELA 5. Índice Enzimático das linhagens de *Streptomyces* spp. referente a produção de diferentes enzimas extracelulares.

Gênero/Espécie	Atividade Enzimática ¹			
	IBSBF	Amilolítica	Pectinolítica	Proteásica
<i>S. scabiei</i>	1884	1,3	2,7	-
	1886	2,0	3,6	-
	1936	1,7	4,0	-
	2005	2,6	4,9	2,1
	2006	1,4	3,7	1,8
	2124	1,5	1,1	1,3
	2147	1,8	3,9	1,1
	2203	1,6	1,9	1,5
	2204	2,0	1,8	1,3
	2228	1,6	1,5	1,4
	2243	1,2	2,4	-
	2248	1,2	3,3	1,5
	2250	1,5	1,6	-
	2257	1,4	2,2	1,2
	2282	1,7	1,3	1,5
	2292	1,6	1,4	1,6
	2298	1,5	3,7	-
	2315	1,5	2,1	1,3
	2316	2,0	3,5	-
	2317	1,4	3,0	-
	2359	1,8	2,1	1,5
	2388	1,4	5,0	-
	2403	2,2	5,5	-
	2475	2,1	3,1	1,4
2500	1,7	1,3	1,1	
2501	1,1	5,2	-	
2502	1,1	1,1	1,1	
2523	2,1	2,2	1,4	
<i>S. europaeiscabiei</i>	1943	2,0	2,6	1,1
	1944	2,7	1,6	2,9
	2162	2,3	2,8	1,2
	2472	2,0	#	1,5
	2473	1,3	2,8	1,5
	2474	2,3	3,1	1,7
	2498	2,9	1,4	1,3
	2499	-	-	1,9
	2508	-	4,3	1,3
	2510	0,8	3,0	3,4
<i>S. caviscabies</i>	2021	4,1	5,2	1,8
	2236	3,0	4,8	2,5
	2260	3,1	4,9	2,0
	2368	3,2	4,0	2,0
	2392	3,2	4,8	1,9
<i>S. sampsonii</i>	2360	2,9	4,2	3,7

Continuação tabela 5.

Gênero/Espécie	Atividade Enzimática ¹			
	IBSBF	Amilolítica	Pectinolítica	Proteásica
<i>Streptomyces</i> sp.	2019	2,8	3,5	2,6
	2229	1,2	5,1	1,7
	2247	1,1	1,0	-
	2343	3,5	5,4	3,3
	2352	-	1,9	-
	2390	-	2,7	-
	2395	-	3,0	-
	2397	2,7	3,4	2,3
	2402	2,8	3,8	2,6
	2430	2,2	3,0	2,2
	2431	3,7	3,9	2,7
	2439	2,2	3,7	2,6
	2449	1,9	3,7	2,6
	2486	2,3	3,4	2,6
	2503	-	4,6	1,2
	2507	1,6	5,9	1,5
	2509	-	2,0	-
2520	1,9	5,2	-	
2528	1,4	2,3	1,5	

Índice Enzimático (diâmetro dos halos de atividade enzimática em mm/ diâmetro da colônia em mm),

(-) refere-se a ausência de atividade.