



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA – PPGDB

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETOS ASSOCIADOS A
LIQUENS FOLHOSOS DE ECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS**

NÉLLY MARA VINHOTE DA SILVA

MANAUS

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA – PPGDB

NÉLLY MARA VINHOTE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETOS ASSOCIADOS A
LIQUENS FOLHOSOS DE ECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, em cumprimento as exigências para obtenção do grau de Mestre em Diversidade Biológica, área de concentração Caracterização da Biota Amazônica.

Orientador: Prof. Doutor Spartaco Astolfi Filho

Co-Orientador: Prof. Doutor Takeshi Matsuura

MANAUS

2008

NÉLLY MARA VINHOTE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETOS ASSOCIADOS A
LIQUENS FOLHOSOS DE ECOSISTEMAS AMAZÔNICOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, em cumprimento as exigências para obtenção do grau de Mestre em Diversidade Biológica, área de concentração Biodiversidade Amazônica.

Aprovado em 11 de março de 2008

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE: Doutor Takeshi Matsuura (UFAM)

TITULAR: Doutora Maria Ivone Lopes (UFAM)

TITULAR: Doutora Luciana Leomil (UFAM)

TITULAR: Doutor José Odair Pereira (UFAM)

Dedico *in memorium* a meu pai,
Moysés Cirilo da Silva

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por seu amor incondicional, por sua graça maravilhosa, por sua misericórdia que se renova dia após dia e por seu cuidado dispensado a mim!

À minha família, mãe Nelma Vinhote por seu amor e cuidado. E aos meus manos Marcelo, Nellyane e Murilo, por me darem o suporte de que necessito vocês são muito preciosos!!!

A Thiago Marinho e sua família, por seu amor, carinho e atenção e por me ajudar a concluir esta etapa da minha vida!

Aos meus orientadores, Professor Doutor Spartaco Astolfi Filho e ao Professor Doutor Takeshi Matsuura, por terem aceitado mais este desafio;

A Professora Doutora. Maria Francisca Simas Teixeira, simplesmente por sua vida ser um exemplo de bravura e amor à ciência;

Aos Professores, técnicos e estagiários do Laboratório de Microbiologia, especialmente ao Professor MSc. Januário Gama, MSc. Felipe Cruz e ao técnico Beckman;

A Coordenação de Aperfeiçoamento a Pesquisa do Ensino Superior – CAPES, a Universidade Federal do Amazonas – UFAM e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pelo apoio e auxílio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, Doutora Ormezinda, Prof^a Doutora Ivone, Teresa, Hérlon, Larissa, Josy, Rosana, Renata, Lorisa e Michel, foram tantos momentos de aprendizado!!!

A Professora Doutora Ana Porto, as amigas Germana Michelle, Márcia Karine e Suanni Lemos, pela recepção e auxílio na cidade do Recife.

A Professora Doutora Janete Magali do Departamento de Antibióticos-UFPE, pelos ensinamentos e auxílio na pesquisa, e a todos do Laboratório do Dept^o. de Antibióticos (Professores, Técnicos e alunos) em especial a Fátima Regina, Orlando, Vânia, Ricardo e Ivana.

Aos alunos da primeira turma do Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica (minha turma) Adriano Oliveira, Dhane Eyre Albuquerque, Ilton Oliveira, Josy Caldas, Laís Dias, Michel Martins, Sihame Araújo e Wanessa Cruz.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, em especial as amigas que estão sempre por perto, mesmo quando à distância nos separa: Janaína Vasconcelos, Nayelen Oliveira e Vera Lúcia Cavalcante.

Por amor, subimos montanhas, atravessamos mares,
cruzamos desertos e enfrentamos todo tipo de adversidade.

Sem amor, montanhas tornam-se insuperáveis, mares
intransponíveis, desertos insuportáveis e dificuldades
avolumam-se pela vida afora.

Gary Chapman

RESUMO

O estudo de habitats pouco explorados com a finalidade de obter biocompostos de interesse biotecnológicos produzidos pela diversidade biológica da Amazônia é uma estratégia que permitirá a descoberta de importantes princípios bioativos. Dentre a biodiversidade microbiana, destacam-se os actinomicetos, que são um grupo de bactérias de organização filamentosa que ocorrem em uma grande variedade de substratos e apresentam múltiplas aplicações na indústria farmacêutica, principalmente no que tange a produção de antimicrobianos. Este trabalho teve como escopo analisar taxonomicamente os actinomicetos associados a líquens e determinar a capacidade destas bactérias em produzir antibióticos. Foram coletadas dez amostras de líquens folhosos das árvores presentes na área do Campus Universitário, Setor Sul, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Para o isolamento dos actinomicetos foram utilizados os meios de cultivo: Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte-Amido (ISP-2A), Ágar Caseína-Amido (CAA), Ágar Rafinose-Histidina (RHA) e Ágar-Água (AA), suplementados com antifúngicos. Como resultados foram isolados 71 actinomicetos associados aos líquens. Os isolados foram testados quanto à caracterização da atividade antimicrobiana contra oito microrganismos-teste, através de técnicas em meio sólido e em meio líquido. Das linhagens de actinomicetos testados, 80% apresentaram atividade antimicrobiana em meio sólido, principalmente contra *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. No ensaio em meio líquido, 79% das linhagens foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos-teste, sendo que as maiores atividades foram detectadas contra *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus*. A atividade antimicrobiana dos isolados variou de moderada (halo=13 a 18 mm) a alta (halo=19 a 35 mm) atividade. Observou-se que 68% dos isolados em meio sólido apresentaram alta atividade antimicrobiana frente aos microrganismos-teste. A identificação dos actinomicetos se deu em nível de gênero, através da determinação da micromorfologia, testes fisiológicos e da determinação de aminoácidos da parede celular, sendo a grande maioria pertencente ao gênero *Streptomyces*. Os microrganismos foram preservados por congelamento a -20 °C e através da técnica de preservação em água (método de Castellani).

Palavras-chave: Biodiversidade Amazônica, Metabólitos Secundários, Atividade Antimicrobiana, Actinomicetos, Líquens.

ABSTRACT

The study of habitats that have been few explored with purpose of obtaining composts with biotechnological interest that has been produced by the Amazonian's biological diversity it's a strategy that will allow the discovery of important bioactive principles. In microbial biodiversity, the actinomycetes represents the most important bacterial group. They have a filamentous organization that occur in great varieties of substrata and present a great application in pharmaceutical industry. The scope of this work was to analyze taxonomically the actinomycetes associated at lichens and to determine the capability of these bacteria for antibiotic producing. Ten samples of foliose lichens were collected in area Federal University of Amazonas (UFAM), South Section. For the isolation of actinomycetes were utilized the culture media Yeast Extract-Malt Extract Agar-Starch (ISP-2A), Casein-Starch Agar (CAA), Raffinose-Histidin Agar (RHA) and Water Agar (AA), added with antifungics. Were isolated 71 actinomycetes associated to foliose lichens. The isolated were tested for antimicrobial activity against eight microorganisms-test by the techniques with cultivation in solid medium and broth culture. Among the actinomycetes tested by solid medium 80% shown antimicrobial activity, mainly against *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. In assay by broth cultivation 79% of the actinomycetes inhibited the growth of microorganisms-test, although the higher activities were against *Mycobacterium smegmatis* and *Staphylococcus aureus*. The isolated antimicrobial activity varied from moderate (halo=13 at 18 mm) to high (halo=19 at 35 mm) activity. It was observed that 68% of isolated presented high antimicrobial activity. The identification of the actinomycetes was done by the macro and micromorphological determination, physiologic tests and by the determination of aminoacids from the cell wall, and most of them belonging to genus *Streptomyces*. The microorganisms were preserved by freezing at -20 °C and by preservation of actinomycetes colony directly in water (Castellani's method).

Key words: Amazon Biodiversity, Secondary Methabolites, Antimicrobial Activity, Actinomycetes, Lichens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 01	Microrganismos-teste utilizados na caracterização da atividade antimicrobiana.....	20
Figura 01	Microrganismo-teste utilizado na caracterização da Atividade Antimicrobiana.....	28
Figura 02	Identificação dos actinomicetos isolados de líquens folhosos de ecossistemas amazônicos.....	35
Figura 03	Atividade antimicrobiana em bloco de gelose dos actinomicetos isolados de líques.....	36
Figura 04	Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco dos actinomicetos isolados.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantitativo de amostras de actinomicetos isolados de líquens nos meios de cultivo.....	31
Tabela 2	Caracterização morfológica de amostras de actinomicetos isolados de líquens.....	32

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1.1 Diversidade microbiana	12
1.2 Os actinomicetos	13
1.3 Habitats invasores	13
1.4 Os líquens	14
1.5 Potencial Biotecnológico	15
1.6 Potencial Farmacológico dos actinomicetos	16

2. OBJETIVOS

2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra	18
3.2 Coleta, acondicionamento e transporte das amostras	18
3.3 Isolamento dos actinomicetos dos líquens	18
3.4 Identificação dos actinomicetos	18
3.4.1 Macromorfologia e micromorfologia	18
3.4.2 Determinação de aminoácidos presentes na parede celular	19
3.5 Caracterização da atividade antimicrobiana	19
3.5.1 Ensaio da atividade antimicrobiana em meio sólido	20
3.5.2 Ensaio para atividade antimicrobiana por difusão em disco	20
3.6 Preservação dos actinomicetos	21
3.7 Análise estatística	21

4. ARTIGO - **Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems**

22

REFERÊNCIAS

43

ANEXOS

49

INTRODUÇÃO

1.1 Diversidade Microbiana

Os microrganismos são entidades bióticas que são capazes de colonizar com sucesso cada nicho ecológico possível do planeta. Além disso, representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento econômico sustentável (OLIVEIRA et al., 2006).

O número de espécies microbianas identificadas cresce a cada ano, sendo formalmente descritos mais de 70.000 fungos, 36.000 protozoários, 30.000 algas, 5.000 bactérias e 3.600 vírus. Mas esses números ainda estão longe do total de espécies microbianas, estimado em mais de dois milhões (ROSSELÓ-MORA, 2001; AMANN, 2001; FAORO, 2006).

O Brasil detém cerca de 20% da diversidade biológica mundial (SUDAM, 1995; DIAS, 1996; SOUZA et al., 2004) e uma parcela considerável desta biodiversidade está localizada nos ecossistemas Amazônicos, que abriga uma das últimas extensões contínuas de florestas tropicais úmidas da Terra, detendo cerca de 1/3 do estoque genético planetário. O aproveitamento dos recursos genéticos amazônicos, a partir de seus usos pelas novas biotecnologias, embora seja uma questão emergente, é ainda pouco compreendida, mensurada e principalmente incorporada às políticas governamentais e às estratégias empresariais direcionadas para a região (ALBAGLI, 2001).

Apesar da imensa diversidade biológica da Amazônia, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, especialmente as interações dos microrganismos com os outros seres (SEIDL, 1993; SOUZA et al., 2004). A razão para o baixo número de espécies formalmente descritas são as necessidades do cultivo celular no processo de identificação dos microrganismos, o que na grande maioria das vezes não é possível (PACE et al., 1986). Bull et al. (2000) e Conti (2007) relataram que menos de 1% das bactérias e apenas 7% dos fungos, foram isolados e cultivados em laboratório, precisando de novas tecnologias para o cultivo destes microrganismos.

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se uns dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes

organismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial (OLIVEIRA et al., 2006).

1.2 Os actinomicetos

Dentre a biodiversidade bacteriana, destacam-se os actinomicetos, que são um grupo de bactérias de organização filamentosa, muitas vezes ramificada, cuja característica comum é a formação de micélio aéreo e/ou vegetativo em algum estágio de seu ciclo de vida (McCARTHY; WILLIAMS, 1990). As características essenciais da natureza procariótica dos actinomicetos são a ausência de membrana nuclear, a ausência de organelas citoplasmáticas e a presença de ribossomos 70S (STANIER et al., 1980; WOESE, 1992). Essas bactérias são na grande maioria aeróbias estritas, Gram-positivas com alto conteúdo de Guanina e Citosina (G + C), e formam filamentos ramificados ou hifas que podem persistir como micélio estável ou podem se quebrar em elementos na forma de bacilos ou cocos (HOLT et al., 1994).

Os actinomicetos ocorrem em uma grande diversidade de habitats naturais e artificiais, crescendo em uma variedade de substratos. O solo é o ambiente mais comum para os actinomicetos, onde ocorrem em uma proporção de aproximadamente um milhão de células por grama de solo. Embora a maioria seja sapróbio estrito, alguns formam associações parasíticas ou simbióticas com plantas ou animais. (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). Apesar de o solo ser o principal substrato para os actinomicetos, estes também são encontrados na água, em tecidos vegetais e em tecidos animais (WILLIAMS; CROSS, 1974). Essa ubiquidade dos actinomicetos sapróbios em ambientes naturais possuem dois fatores principais: diversidade metabólica e evolução de mecanismos específicos de dispersão (McCARTHY; WILLIAMS, 1990).

1.3 Habitats inovadores

O estudo de habitats pouco explorados buscando isolar actinomicetos da Amazônia produtores de novos compostos bioativos é uma estratégia que permitirá a descoberta de princípios ativos ainda desconhecidos e com importantes aplicações biotecnológicas. Pesquisas realizadas por González et al. (2005); Terkina et al. (2006); Chin et al. (2006); Cardinale et al. (2006) e Gunatilaka (2006) mostram a importância de se explorar a biodiversidade na busca por produtos naturais e sua importância no desenvolvimento de diversos bioprodutos.

1.4 Os líquens

O líquen é uma associação simbiótica entre um fungo e um microrganismo fotossintetizante. O componente fúngico de um líquen (o micobionte) é, em sua grande maioria, um fungo do Filo Ascomycota (acima de 95%) e, mais raramente, Basidiomycota. O componente fotossintetizante (fotobionte, também chamado de ficobionte em alusão à alga) é, em geral, uma Chlorophyta ou uma Cyanobactéria, no qual o micobionte protege o fotobionte dos extremos de temperatura e umidade, que em contrapartida oferece os produtos da fotossíntese (SEAWARD, 1977; NASH, 1996). A organização estrutural e morfológica dos talos líquênicos se apresenta sob muitos hábitos (formas de crescimento; aparência). Esses hábitos separam morfológicamente os líquens em tipos, como: fruticuloso (fruticoso, arbustiva) o talo pode se apresentar na forma de um arbusto em miniatura, com ou sem ramificações, mas sem diferenciação dorsi-ventral; quando o lado ventral está firmemente ligado ao substrato ou ao ponto de fixação, sendo impossível separá-los, denomina-se crustoso (crustáceo) e em outros casos, há uma nítida diferenciação dorsiventral, sendo o talo formado por uma fita ramificada ou não, facilmente separável do ponto de fixação, apresentando o formato folhoso (foliáceo) (MARCELLI, 1996).

Dessa associação resultam muitas substâncias líquênicas que participam ativamente da dinâmica microbiana no solo, como também possuem grande espectro de aplicação biotecnológica (NASH III, 1996). Os metabólitos secundários dos líquens, especialmente os ácidos líquênicos, possuem atividade antibiótica e citotóxica, sendo fontes potenciais de novos antibióticos e drogas anti-neoplásicas. Por serem extremamente sensíveis a poluentes atmosféricos, inclusive os acumulando, os líquens são excelentes bioindicadores e biomonitores da qualidade do ar. Testes com líquens comprovam a ocorrência frequente de metabólitos com propriedades antibacteriana, antimicobacteriana, antiviral, antitumoral, analgésica e antipirética (MULLER, 2001).

Os líquens são cosmopolitas, sendo encontrados em todos os possíveis tipos de ambientes terrestres, inclusive aqueles mais extremos, como desertos, geleiras e afloramentos rochosos. Mesmo os componentes simbióticos dos líquens já terem sido descritos extensivamente, porém a comunidade microbiana que habita estes nichos ainda não foi bem caracterizada. Os líquens constituem um reservatório rico, para o isolamento de uma grande diversidade de actinomicetos, muitos deles representando uma fonte inexplorada, rica de metabólitos secundários (GONZÁLEZ et al., 2005).

1.5 Potencial Biotecnológico

Existe em todo o mundo uma crescente busca de microrganismos com potencialidade biotecnológica. A descoberta de novos microrganismos, bem como sua preservação e classificação apropriada, passa a ser imprescindível para que a biodiversidade seja convenientemente utilizada, mantida e transformada em riquezas (AZEVEDO, 1998).

A comunidade de microrganismos existentes possui uma ampla diversidade biológica e bioquímica e representa um recurso ainda pouco explorado e de enorme valor para o futuro (LABEDA, 1990; BULL; HARDMAN, 1991). Desde a segunda metade do século XX foram originados cerca de 50.000 produtos naturais provenientes de microrganismos, dos quais mais de 10.000 são biologicamente ativos e mais de 8.000 são agentes antibióticos e antitumorais (FENICAL, 1993).

A exploração dos microrganismos pela indústria gera bilhões de dólares a cada ano. O valor dos microrganismos é geralmente avaliado pela potencial aplicação direta nos processos biotecnológicos ou valor de mercado dos produtos derivados (KURTBÖKE et al., 2004).

Os microrganismos podem produzir uma variedade muito grande de metabólitos tanto primários quanto secundários (SOUZA et al., 2004) incluindo enzimas (STAMFORD et al., 1998), aminoácidos (KLEINKAUF; VON DOHREN, 1990), vitaminas, antibióticos, pigmentos (DEMAIN, 1992), agentes moduladores de respostas imunológicas (TRILLI et al., 1978), toxinas (BACH; KIMATI, 1999), agentes anti-tumorais (WANG et al., 2000), fatores de crescimento de plantas (ALEXOPOULOS, 1996), anti-helmínticos (RODRIGUES et al., 2000) e antifúngicos (LI; STROBEL, 2001).

Em decorrência do potencial biotecnológico dos microrganismos, esses metabólitos constituem os principais produtos de interesse econômico para a agricultura, medicina e indústria farmacêutica (DEMAIN, 2000; ADRIO; DEMAIN, 2003).

Pesquisas demonstram que a segunda maior causa de morte no mundo é ocasionada por doenças infecciosas em decorrência a alta prevalência de microrganismos patogênicos resistentes a diversos antibióticos sendo necessário, portanto, a busca por novos antimicrobianos mais eficazes e de baixa toxicidade (LEVY; MARSHALL, 2004; APPELBAUM; JACOB, 2005; YONEYAMA; KATSUMATA, 2006; BUTLER; BUSS, 2006; RATTI, 2007; CONTI, 2007).

Atualmente, mais de 70% das espécies das bactérias que causam infecções, são resistentes a pelo menos um dos antibióticos comumente utilizados na terapêutica como enfatizado por Overbye; Barret (2005). Contudo, Ujikawa (2003) afirma que está se tornando

cada vez mais raro a descoberta de novos tipos de antibióticos, encontrando-se apenas variações de classes conhecidas (KNOWLES, 1977; OMURA, 1992).

Para contornar esta situação, a biossintese de metabólitos bioativos precisa ser melhorada, através da utilização de novas tecnologias e alternativas como: engenharia genética; biossintese mutacional; triagem de alta produtividade; e uma maior eficiência na identificação de moléculas, de forma a viabilizar economicamente o processo (BULL et al., 2000; PAREKH et al., 2000; HIGGS et al., 2001; FLOSS, 2001; BOGGS; MILLER, 2004; BUTLER, 2004; GULLO; HUGHES, 2005; SAMIULLA et al., 2005; WEIST; SUSSMUTH, 2005; CONTI, 2007).

1.6 Potencial farmacológico dos actinomicetos

Entre os antibióticos isolados, aproximadamente 68% são elaborados por actinomicetos, 14% por vegetais superiores, 10 a 15% por fungos imperfeitos, próximo do mesmo valor por bactérias do gênero *Bacillus*, cerca de 6% são sintetizados por Basidiomycetes e Ascomycetes e aproximadamente 2% são de origem animal (PHAFF, 1991).

Os actinomicetos têm sido especialmente úteis na indústria farmacêutica por sua capacidade ilimitada de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas. A produção de 2/3 dos antibióticos de ocorrência natural é de actinomicetos.

Dentre os actinomicetos, o que mais desperta interesse científico é o gênero *Streptomyces*, responsável pela produção de mais de 80% dos antibióticos atualmente utilizados (CHALIS; HOPWOOD, 2003; RATTI, 2007), seguido pelos gêneros *Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptosporangium* e *Actinoplanes* (CROSS, 1981).

A devida caracterização e preservação dos recursos microbianos são fatores de fundamental importância para o desenvolvimento da bioeconomia no século 21 (OLIVEIRA et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar taxonomicamente os actinomicetos isolados de líquens folhosos e determinar a capacidade destas bactérias em produzir antibióticos.

2.2 Específicos

- Isolar actinomicetos de líquens folhosos, empregando diferentes meios de cultivo;
- Classificar taxonomicamente os actinomicetos isolados;
- Testar as amostras isoladas quanto à capacidade de produção de compostos com atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos ao homem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra

Foram coletados 10 espécimes de um líquen folhoso das árvores presente na área da floresta do Campus Universitário, Setor Sul, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM (Sul 3° 5' 56'' / Oeste 59° 58' 56'') Manaus/AM.

3.2 Coleta, acondicionamento e transporte das amostras

As amostras foram coletadas com auxílio de uma espátula metálica limpa com solução de etanol a 70%, acondicionadas individualmente em placas de Petri vazias estéreis, mantidas em caixas isotérmicas e processadas em laboratório.

3.3 Isolamento dos actinomicetos dos líquens

Foram pesados 300 mg de cada líquen, estes foram lavados duas vezes com água destilada estéril, e em seguida triturados e homogeneizados com 30 mL de água destilada estéril. Após esse processo foram realizadas diluições sucessivas para isolamento dos actinomicetos. Foram inoculados 0,1 mL da diluição nos meios de cultura Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte - Amido (ISP-2A), Ágar Caseína-Amido (CAA), Ágar Rafinose-Histidina (RHA) e Ágar-Água (AA), contendo o antifúngico cicloheximida (80 µg/mL) (González et al., 2005) ou nistatina, e as placas foram incubadas a 30 °C por até 21 dias.

3.4 Identificação dos actinomicetos

3.4.1 Macromorfologia e micromorfologia

A inoculação das actinobactérias nos meios ISP-2, ISP-6 e ISP-7 a 30 °C por até 21 dias, permitiram o estudo da macromorfologia das colônias, avaliando-se visualmente a coloração do verso e anverso das colônias e a produção de pigmento melanínico solúvel.

O estudo da micromorfologia das linhagens cultivadas nos meios ISP-2, ISP-3, ISP-4 e ISP-5, e incubadas a 30 °C por até 21 dias, foi realizada através de microscopia óptica, avaliando-se a morfologia e o formato das cadeias de esporos.

3.4.2 Determinação de aminoácidos presentes na parede celular

O estudo da parede celular dos actinomicetos consistiu na determinação do tipo de aminoácido presente (STANECK; ROBERTS, 1974). Os actinomicetos foram cultivados em Caldo ISP-2 a 30 °C sob agitação a 180 rpm por 72 horas. Após esse período a massa celular foi filtrada a vácuo e seca em estufa a 50 °C por 2 horas. Transferiu-se 30 mg da massa seca do actinomiceto para um tubo com tampa rosqueável (10 x 90 mm), onde foi adicionado 1 mL de solução de HCl 6 N e colocado na estufa a 100 °C por 16 horas para ocorrer a hidrólise da parede celular. O material insolúvel foi removido utilizando um eppendorf furado contendo lâ de vidro e lavado com 1 mL de água destilada. O filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo e levado ao rotaevaporador para retirar todo o ácido remanescente. Várias lavagens foram efetuadas até a retirada completa do ácido. O material livre do ácido foi ressuspensionado em 0,1 mL de água destilada, transferido para tubos de eppendorf e armazenados em freezer até a realização da corrida em Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

A fase móvel foi composta por metanol-água-ácido clorídrico 6N-piridina (80:26:4:10, v/v) e a fase estacionária por placas de celulose, com dimensões de 20 x 20 cm (Merck nº 5716). Na fase fixa foram aplicados, lado a lado, 2 µL do padrão do ácido diaminopimélico (DAP) a 0,19% (m/v), 2 µL das hidrólises das amostras desconhecidas e 2 µL das hidrólises de actinomicetos conhecidos: *Streptomyces olindensis* (DAUFPE 5622), *Streptomyces regensis* (DAUFPE-3053), e *Nocardia asteroides* (DAUFPE-3503). A cuba foi previamente saturada por 2 horas e desenvolvida por aproximadamente 5 horas. A placa foi seca a temperatura ambiente, na câmara de segurança química, e borrifada por uma solução de ninhidrina a 0,2% m/v, aqueceu-se a 100 °C por 5 minutos onde se visualizou os isômeros LL-DAP e meso-DAP.

3.5 Caracterização da Atividade Antimicrobiana

Os actinomicetos isolados foram caracterizados quanto à atividade antimicrobiana através de técnicas em meio sólido (Método Bloco de Gelose) e em meio líquido. Os

microrganismos-teste utilizados neste experimento são os apresentados no Quadro 1, com as respectivas condições de crescimento.

Microrganismo	Meio de Cultivo	Temperatura	Tempo de Cultivo
<i>Aspergillus niger</i> (CCT 1357)	Ágar Sabouraud	30 °C	72 h
<i>Candida albicans</i> (CCT 0776)	Ágar Sabouraud	30 °C	48 h
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCT 1352)	Ágar Müeller-Hinton	37 °C	24 h
<i>Bacillus subtilis</i> (CCT 1359)	Ágar Müeller-Hinton	37 °C	24 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ágar Müeller-Hinton	37 °C	24 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCT 3971)	Ágar Müeller-Hinton	37 °C	24 h
<i>Escherichia coli</i> (CCT 0547)	Ágar Müeller-Hinton	37 °C	24 h
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (DAUFPE-71)	Ágar Müeller-Hinton	30 °C	72 h

Quadro 1- Microrganismos-teste utilizados na caracterização da atividade antimicrobiana.

3.5.1 Ensaio da atividade antimicrobiana em meio sólido

Segundo Ichikawa, et al. (1971) a metodologia também conhecida como “Método do Bloco de Gelose” consistiu em inocular 0,1 mL da suspensão do actinomiceto, na concentração de 10^6 a 10^7 UFC/mL, pela técnica de “spread-plate” em placa de Petri contendo 15 mL do meio de cultura ISP-2 acrescido de amido. Após sete dias de incubação a 30 °C, blocos de gelose circulares de 6 mm de diâmetro, foram transferidos para cada placa contendo, previamente, os microrganismos-teste, obtidos por uma suspensão de células padronizadas na concentração aproximada de $1,2 \times 10^6$ UFC/mL. As placas foram incubadas respeitando as características fisiológicas de cada microrganismo-teste. Após o período de incubação dos microrganismos-teste, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição de crescimento de cada bloco e foi determinada a atividade antimicrobiana do actinomiceto.

3.5.2 Ensaio para atividade antimicrobiana por difusão em disco

A atividade antimicrobiana em meio líquido foi desenvolvida baseando-se na metodologia descrita por Waksman; Woodruff (1941) que consistiu no crescimento do actinomiceto, sob agitação a 150 rpm, no meio de cultivo líquido MPE, por um período de 96

horas a 30° C. A concentração de células inoculadas foi de 10^6 a 10^7 UFC/mL. Ao final do período de crescimento, 10 µL do líquido metabólico foi retirado e transferido para um disco de papel com 6 mm de diâmetro, e introduzido em placas de Petri contendo, previamente, os microrganismos-teste, obtidos por uma suspensão de células padronizadas na concentração aproximada de $1,2 \times 10^6$ UFC/mL, semeados pela técnica de “spread-plate”. Após o período de incubação, os halos de inibição de crescimento dos microrganismos-teste, de cada disco, foram mensurados e determinou-se a atividade inibitória do actinomiceto.

3.6 Preservação dos actinomicetos

Os microrganismos isolados foram preservados por congelamento a -20 °C, e através da técnica de preservação em água (Método de Castellani), descritos em Muro; Luchi (1989).

3.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva cujo objetivo é o de sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo dessa forma que se tenha uma visão global da variação desses valores, organizar e descrever os dados de três maneiras: por meio de tabelas, de gráficos e de medidas descritivas (REIS, 1998).

4. ARTIGO

Australian Journal of Basic and Applied Sciences

Manuscript Review Form

(To be returned to the author, no reviewer identifiers please)

Manuscript Title:

Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems

Manuscript No.: 2575-AJBAS

Manuscript Type: Research ☒ Review Case Study Short Communication

Note: ☒ shows selected option.

Other comments (If any): no comments

Conclusion: 1 - Publish as it is

2 - Publish with minor corrections ☒

3 - Send for corrections

4 - Reject

Date: 05-04-2010

Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems

Nélly Mara Silva-Vinhote¹; Thiago Marinho-Pereira²; Spartaco Astolfi-Filho³; Takeshi Matsuura¹

¹ Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Laboratório de Microbiologia; Av. Gal. Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 3000, Aleixo; CEP 69.000-070; Manaus-Amazonas-Brasil.

² Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – CPAQ/INPA; Av. André Araújo, 2936, Aleixo; CEP 69.083-000; Manaus-Amazonas-Brasil.

³ Departamento de Biologia, Universidade Federal do Amazonas – UFAM/CAM – Centro de Apoio Multidisciplinar; Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Aleixo; CEP 69.000-070; Manaus-Amazonas-Brasil.

* e-mails: nmvinhote@hotmail.com
tmatsuura@uol.com.br

Caracterização Taxonômica e Atividade Antimicrobiana de Actinomicetos Associados a Líquens Folhosos de Ecossistemas Amazônicos

Resumo

O estudo de habitats pouco explorados com a finalidade de obter biocompostos de interesse biotecnológicos produzidos pela diversidade biológica da Amazônia é uma estratégia que permitirá a descoberta de importantes princípios bioativos. Dentre a biodiversidade microbiana, destacam-se os actinomicetos, que são um grupo de bactérias de organização filamentosa que ocorrem em uma grande variedade de substratos e apresentam múltiplas aplicações na indústria farmacêutica, principalmente no que tange a produção de antimicrobianos. Este trabalho teve como escopo analisar taxonomicamente os actinomicetos associados a líquens e determinar a capacidade destas bactérias em produzir antibióticos. Foram coletadas dez amostras de líquens folhosos das árvores presentes na área do Campus Universitário, Setor Sul, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Para o isolamento dos actinomicetos foram utilizados os meios de cultivo: Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte-Amido (ISP-2A), Ágar Caseína-Amido (CAA), Ágar Rafinose-Histidina (RHA) e Ágar-Água (AA), suplementados com antifúngicos. Como resultados foram isolados 71 actinomicetos associados aos líquens. Os isolados foram testados quanto à caracterização da atividade antimicrobiana contra oito microrganismos-teste, através de técnicas em meio sólido e em meio líquido. Das linhagens de actinomicetos testados, 80% apresentaram atividade antimicrobiana em meio sólido, principalmente contra *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. No ensaio em meio líquido, 79% das linhagens foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos-teste, sendo que as maiores atividades foram detectadas contra *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus*. A atividade antimicrobiana dos isolados variou de moderada (halo=13 a 18 mm) a alta (halo=19 a 35 mm) atividade. Observou-se que 68% dos isolados em meio sólido apresentaram alta atividade antimicrobiana frente aos microrganismos-teste. A identificação dos actinomicetos se deu em nível de gênero, através da determinação da micromorfologia, testes fisiológicos e da determinação de aminoácidos da parede celular, sendo a grande maioria pertencente ao gênero *Streptomyces*. Os microrganismos foram preservados por congelamento a -20 °C e através da técnica de preservação em água (método de Castellani).

Palavras-chave: Biodiversidade Amazônica, Metabólitos Secundários, Atividade Antimicrobiana, Actinomicetos, Líquens.

Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems

Abstract

The study of habitats that have been few explored with purpose of obtaining composts with biotechnological interest that has been produced by the Amazonian's biological diversity it's a strategy that will allow the discovery of important bioactive principles. In microbial biodiversity, the actinomycetes represents the most important bacterial group. They have a filamentous organization that occur in great varieties of substrata and present a great application in pharmaceutical industry. The scope of this work was to analyze taxonomically the actinomycetes associated at lichens and to determine the capability of these bacteria for antibiotic producing. Ten samples of foliose lichens were collected in area of Universidade Federal do Amazonas (UFAM), South Section. For the isolation of actinomycetes were utilized the culture media Yeast Extract-Malt Extract Agar-Starch (ISP-2A), Casein-Starch Agar (CAA), Raffinose-Histidin Agar (RHA) and Water Agar (AA), added with antifungics. Were isolated 71 actinomycetes associated to foliose lichens. The isolated were tested for antimicrobial activity against eight microorganisms-test by the techniques with cultivation in solid medium and broth culture. Among the actinomycetes tested by solid medium 80% shown antimicrobial activity, mainly against *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. In assay by broth cultivation 79% of the actinomycetes inhibited the growth of microorganisms-test, although the higher activities were against *Mycobacterium smegmatis* and *Staphylococcus aureus*. The isolated antimicrobial activity varied from moderate (halo=13 at 18 mm) to high (halo=19 at 35 mm) activity. It was observed that 68% of isolated presented high antimicrobial activity. The identification of the actinomycetes was done by the macro and micromorphological determination, physiologic tests and by the determination of aminoacids from the cell wall, and most of them belonging to genus *Streptomyces*. The microorganisms were preserved by freezing at -20 °C and by preservation of actinomycetes colony directly in water (Castellani's method).

Key words: Amazon Biodiversity, Secondary Methabolites, Antimicrobial Activity, Actinomycetes, Lichens.

Introduction

In global level is considered that the diversity of microorganisms exceeds in order of some thousands the diversity of plants and animals. Brazil has about 20% of the world biological diversity (SUDAM, 1995; Dias, 1996; Souza et al., 2004) and a considerable portion of this biodiversity is located in Amazonian ecosystems, incommensurable source of raw materials for the most several areas of biotechnological application.

Among the microbial biodiversity, the actinomycetes represent a bacteria group of filamentous organization, many times ramified, whose common characteristic is the formation of aerial and/or vegetative mycelium in some stage of its life cycle (McCarthy; Williams, 1990). The actinomycetes occur in a great diversity of natural and artificial habitats, growing in a large variety of substrata (Williams; Cross, 1974).

The lichen is a symbiotic association between a fungal and a microorganism photosynthetic. The lichen fungal component (mycobiont) is in great majority a fungal of the phylo Ascomycota (above 95%) and, rarely, Basidiomycota. The photosynthetic component (photobiont, also knew ficobionte in allusion to the algae) it is, in general, a Chlorophyta or a cyanobacteria (Seaward, 1977; Nash, 1996).

Even the symbiotic components of the lichens have already been described extensively, however the microbial community that habits these niches still remain not characterized. The lichens constitute a rich reservoir for the isolation of a great variety of actinomycetes diversity, many of them representing an unexplored source, rich in secondary metabolites (González et al., 2005).

In nowadays, more than 70% of the species of the bacteria that cause infections are resistant at least one of the antibiotics commonly used on therapeutics as it is emphasizes for Overbye and Barret (2005). The actinomycetes have especially been useful in the pharmaceutical industry for limitless capacity to produce secondary metabolites with many chemistries structures and biological activities.

The actinomycetes bioprospection in innovative habitats is a strategy that makes possible the discovery of relevant biotechnological bioactive principles, more scientific knowledge about the microbial diversity, better understanding about functions of microbial communities in the environment and knowledge of these interactions with others components of the biodiversity.

This work proposes to characterize taxonomically the actinomycetes isolated from folioses lichens and to determine the capacity of these bacteria in producing antibiotics.

Material and Methods

Samples

Ten samples of foliose lichen were collected from the trees of Amazon Federal University (UFAM) campus, south sector, (Sul 3° 5' 56'' / Oeste 59° 58'56''), Manaus/AM.

Collect, packing and samples transportation

The samples were collected with a cleaned metal spatula, individually packing in sterile Petri's dishes and kept in isotherm boxes, being processed at laboratory.

Isolation of actinomycetes from liquens

Around 300 mg of each lichen were weighted washed twice with sterile distilled water and homogeneized with 30 mL of sterile distilled water. After this, it was made successive dilutions for the actinomycetes isolation. Were inoculated 0,1 mL of dilutions in culture medium Yeast Extract-Malt Extract Agar (ISP-2), Starch-Casein Agar (SCA), Rafinosis-Histidine Agar (RHA) and Water-Agar (WA), added with antifungal cycloheximide (80 µg/mL) (González et al., 2005) or nistatine, and the plates were incubated at 30 °C during 21 days.

Actinomycetes identification

Macromorphology and micromorphology determination

The actinobacteria inoculated on Petri's dishes with media ISP-2, ISP-6 and ISP-7 at 30 °C per until 21 days permitted the colony macromorphology study. The color and production of soluble melaninic pigment were visually evaluated.

The micromorphology study of isolated actinomycetes on media ISP-2, ISP-3, ISP-4 and ISP-5, incubated at 30 °C until 21 days, and morphology and spore chains format were evaluated through optic microscopy.

Determination of amino acid in cell wall

The study of actinomycetes cell wall consisted in determination of present amino acid type (Staneck; Roberts, 1974). The actinomycetes were cultivated in ISP-2 Broth at 30 °C under shaking at 180 rpm per 72 hours. After this period, the cell mass was filtrated at vacuum and dry at 50 °C per two hours. Were transferred 30 mg of actinomycete dry mass to tube (10 x 90 mm), acidified with 1 mL of HCl 6 N solution and the cell wall was hydrolysed at 100 °C per 16 hours. The insoluble material was removed using one holed eppendorf containing glass wool and washed with 1 mL of distilled water. The filtrated was transferred to balloon of round bottom and evaporated to remove the acid remaining. Several washes were made until the complete retreat of acid. The material free of the acid was resuspended in 0.1 mL of distilled water, transferred for eppendorf tubes and stored in freezer until the accomplishment of thin layer chromatography (TLC).

The mobile phase was composed by methanol-water-acid chloridric 6N-piridine (80:26:4:10, v/v) and the stationary phase by cellulose plates with 20 x 20 cm of dimentions (Merck nº 5716). In stationary phase were applied, side by side, 2 µL of diaminopimelic acid standard (DAP) at 0.19% (m/v), 2 µL of the hydrolysis of unknown samples and 2 µL of the hydrolysis of known actinomycetes: *Streptomyces olindensis* (DAUFPE 5622), *Streptomyces regensis* (DAUFPE-3053), and *Nocardia asteroides* (DAUFPE-3503). The cube was previously saturated for two hours and run per approximately five hours. The cellulose plate was dry at room temperature, sprinkled with ninhidrine solution at 0.2% m/v, and warmed at 100 °C during five minutes and then visualized the LL-DAP e *meso*-DAP isomers.

Antimicrobial activity characterization

The isolated actinomycetes were characterized for antimicrobial activity through solid (Gelose Block Method) and broth media. The microorganisms-test used in this experiment are presented in Figure 1, with the respective growth conditions.

Microorganisms-test	Culture media	Temperature	Period of cultivation
<i>Aspergillus niger</i> (CCT 1357)	Sabouraud Agar	30 °C	72 h
<i>Candida albicans</i> (CCT 0776)	Sabouraud Agar	30 °C	48 h
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCT	Müller-Hinton Agar	37 °C	24 h

1352)			
<i>Bacillus subtilis</i> (CCT 1359)	Müeller-Hinton Agar	37 °C	24 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	Müeller-Hinton Agar	37 °C	24 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCT 3971)	Müeller-Hinton Agar	37 °C	24 h
<i>Escherichia coli</i> (CCT 0547)	Müeller-Hinton Agar	37 °C	24 h
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (DAUFPE-71)	Müeller-Hinton Agar	30 °C	72 h

Fig. 1: Microorganisms-test used for characterization of antimicrobial activity.

Antimicrobial activity assay in solid media

According to Ichikawa et al. (1971), the methodology also known as "Gelose Block Method" consisted in inoculate 0.1 mL of actinomycete suspension in the concentration of 10^6 to 10^7 CFU/mL, for the "spread-plate" technique in Petri plates containing 15 mL of the ISP-2 culture medium added with starch. After seven days of incubation at 30 °C, circular gelose blocks of 6 mm diameter were transferred for each plate containing, previously, the test microorganism, obtained by a suspension of standardized cells in approximated concentration of $1,2 \times 10^6$ CFU/mL. The plates were incubated respecting the physiologic characteristics of each test microorganism. After the incubation period of the test microorganism, the diameter of the growth inhibition of each block was measured and determinate the antimicrobial activity of the actinomycete.

Antimicrobial activity assay in broth culture

The antimicrobial activity by cultivation of actinomycetes in broth was developed with based on methodology describes by Waksman and Woodruff (1941) that consisted in growth the actinomycete under shaking at 150 rpm in MPE broth until a period of 96 hours at 30 °C. The concentration of inoculated cells was 10^6 a 10^7 CFU/mL. At ending of the growth period, 10 µL of metabolic liquid was transferred into a paper disk with 6 mm diameter and introduced in Petri plates containing, previously, the test microorganism, obtained by a suspension of standardized cells in approximate concentration of $1,2 \times 10^6$ CFU/mL, showed by the "spread-plate" technique. After the incubation period, the inhibition growth halo of microorganisms-test, of each disk, were measured and determinated the inhibitory activity of actinomycetes.

Preservation of actinomycetes

The isolated microorganisms were preserved by freezing at -20 °C and by water preservation technique according Castellani (Muro; Luchi, 1989).

Results and Discussion

Microorganisms Isolation

From ten samples of foliose lichens, collected on tropical trees of Amazon area, it was isolated a total of 71 actinomycetes (Table 1).

Table 1: Isolation of actinomycetes from liquens in differents culture media.

LICHENS	CULTURE MEDIA		TOTAL
	ISP-2A	SCA	
L1	03	01	04
L2	12	02	14
L3	04	01	05
L4	02	00	02
L5	17	04	21
L6	09	02	11
L7	05	01	06
L8	03	nd	03
L9	03	01	04
L10	01	nd	01
TOTAL	59 (83%)	12 (17%)	71 (100%)

According to Table 1, these results show that among the four culture media used for the isolation of this filamentous bacteria, the higher efficiency was ISP-2A (83%), followed by SCA (17%), do not being detected none actinomycete growing on RHA or WA, at this experimental conditions. Kitouni et al., (2005), mention that the addition of some sources of carbon and nitrogen as starch, chitin, glycerol, casein, arginine, asparagines, in culture media make favors the growth of actinomycetes/microorganisms isolated of natural substrata in detriment of the nonfilamentous bacteria. Similar observations were verified by Matsuura (1998) for isolation of endophytic actinomycetes.

González (2005) isolated 337 actinomycetes from 25 samples from lichens of three different environments and the isolation rate varied 1 to 45 isolated per lichen, while our work

varied 1 to 21 isolated. On the other hand, Cardinale (2006) studying the microorganisms in nine lichens through molecular techniques obtained only four actinomycetes among 34 bacteria. Those results based the hypothesis that the bacterial communities composition in lichens can be influenced for several biotic and abiotic factors, which it can detach the lichens phylogenetic position, the geographical origin, the substrata, the microhabitat conditions and the pattern of the fungal secondary metabolites (mycobiont).

Identification of Actinomycetes

The isolated actinomycetes were identified by genus level with based on the macro and micromorphologic characteristics and in cell wall study. The morphologic characterization was determinate looking the spore chain format, the mycelia colors (aerial and vegetative mycelium) and pigment production in culture media (Table 2).

Table 2: Morphological characterization of actinomycetes isolated from lichens.

Samples	Spore Chain		Colony color	Color of soluble pigments	Melanin Pigment
	Format	Length			
L1-A1	spirales	short	dark grey	-	-
L1-A2	spirales	short	grey	-	-
L1-A3	spirales	larger	light grey	-	-
L1-A4	spirales	larger	brown	-	-
L2-A5	spirales	larger	dark brown	-	-
L2-A6	spirales	larger	brown	-	-
L2-A7	spirales	short	dark brown	-	-
L2-A8	retinaculiaperti	larger	cream-colored	yellow	-
L2-A9	retinaculiaperti	larger	dark cream-colored	yellow	-
L2-A10	*	*	dark grey	-	-
L2-A11	spirales	larger	dark grey	-	-
L2-A12	spirales	middle	light brown	-	-
L2-A13	retinaculiaperti	larger	brown	-	-
L2-A14	rectiflexibles	larger	cream-colored with borders	-	-
L2-A15	rectiflexibles	larger	cream-colored with borders	-	-
L2-A16	retinaculiaperti	larger	brown dark	-	-
L2-A17	spirales	larger	grey	-	-
L2-A18**	*	larger	white with exsudate	-	-
L3-A19	spirales	middle	brown with exsud. amarelo	-	-
L3-A20	spirales	middle	light grey	-	-
L3-A21	spirales	larger	brown	-	-
L3-A22	spirales	larger	brown with grey	-	-
L3-A23	retinaculiaperti	larger	dark grey	-	-

Table 2: Morphological characterization of actinomycetes isolated from lichens. (continuation)

Samples	Spore Chain		Colony color	Color of soluble pigments	Melanin Pigment
	Format	Length			
L4-A24	rectiflexibles	larger	grey	red	-
L4-A25	spirales	larger	cream-colored	yellow	-
L5-A26	spirales	larger	brown	-	+
L5-A27	retinaculiaperti	larger	dark grey	yellow	-
L5-A28	spirales	middle	light brown	-	+
L5-A29	spirales	middle	brown	-	+
L5-A30	*	*	white with grey	-	-
L5-A31	retinaculiaperti	larger	cream-colored with brown	-	+
L5-A32**	retinaculiaperti	larger	light grey	yellow	+
L5-A33	spirales	larger	light grey	-	+
L5-A34**	rectiflexibles	larger	cream-colored with orange	-	-
L5-A35	retinaculiaperti	larger	dark grey	-	-
L5-A36	*	*	light grey	yellow	-
L5-A37	spirales	short	dark brown	-	+
L6-A38**	spirales	short	dark brown	-	+
L6-A39	spirales	larger	brown	-	+
L6-A40	spirales	short	brown	-	+
L6-A41	spirales	short	light brown	-	+
L6-A42**	spirales	short	brown	-	+
L7-A43	spirales	short	cream-colored	-	-
L7-A44	spirales	short	cream-colored	-	-
L7-A45	rectiflexibles	larger	brown	-	+
L5-A46	spirales	short	dark brown	-	+
L5-A47	spirales	short	brown	-	+
L5-A48	spirales	short	white with grey	-	-
L5-A49	spirales	short	cream-colored with brown	-	-
L5-A50**	retinaculiaperti	larger	white with yellow	yellow	-
L5-A51	spirales	short	white with grey	-	-
L6-A52	*	*	dark grey	-	-
L5-A53	N I				-
L5-A54	spirales	larger	dark grey	-	-
L5-A55	spirales	larger	dark grey	-	-
L6-A56	spirales	larger	brown	-	+
L6-A57	spirales	larger	dark brown	-	+
L6-A58	spirales	larger	light brown	-	+
L6-A59	spirales	larger	brown	-	+
L6-A60	NI				-
L7-A61	spirales	larger	brown	-	+
L8-A62	spirales	short	light brown	-	+
L7-A63	spirales	larger	brown	-	-
L7-A64	spirales	larger	brown	-	+
L8-A65	spirales	short	brown	-	+

Table 2: Morphological characterization of actinomycetes isolated from lichens. (continuation)

Samples	Spore Chain		Colony color	Color of soluble pigments	Melanin Pigment
	Format	Length			
L8-A66	spirales	short	brown	-	-
L9-A67	spirales	short	brown	-	+
L9-A68	spirales	short	brown	-	+
L9-A69	spirales	short	brown	-	+
L9-A70	spirales	short	brown	-	+
L10-A71	spirales	short	brown	-	+

L: Lichen

A: Actinomycete

NI: no identification

* Samples with differentiated morphology

** Exsudate presence

+ Strains grew in media ISP6 e ISP7 that present melanin pigmentation.

- no detect

The Table 2 also shows that from 71 actinomycetes isolated, 75% showed the o spore chain format in *spirales*, 14% with the format in *retinaculiaperti* and 8% has *rectiflexibles* chains spore. Only in 3% did not observe the spore chain formation.

The colonies showed mycelium coloration that varied between grey to brown and white to cream-colored. From this actinomycetes in study, 28 samples presented melaninic pigmentation in the medium ISP-6 e ISP-7 and eight presented different diffusible pigmentation.

The morphological characteristics and characterization of cell wall amino acid of actinomycetes isolated from foliose lichens indicated that from the total of 71 actinomycetes, 90% are *Streptomyces*, whose constituent of cell wall identified was the LL-DAP acid. Another representative genera was *Nocardia* (4%), identified by presence of meso diaminopimelic acid (*meso*-DAP) in cell wall. O'Leary (1988) describes that *Streptomyces* cell wall exist predominance of LL-DAP and glicine; in *Nocardia*, the constituent that showed predominance are *meso*-DAP, rabinose and galactose. Beyond this actinomycetes, were identified *Streptoverticillium* (1.5%) and *Nocardiopsis* (1.5%) based on the mycelium morphologic characteristics and the conidia disposition (longer conidia chain), respectively. In micromorphologic observations did not determinated the samples L5-A53 e L6-A60 (3%) should be realize more deep studies for possible identification (Figure 2).

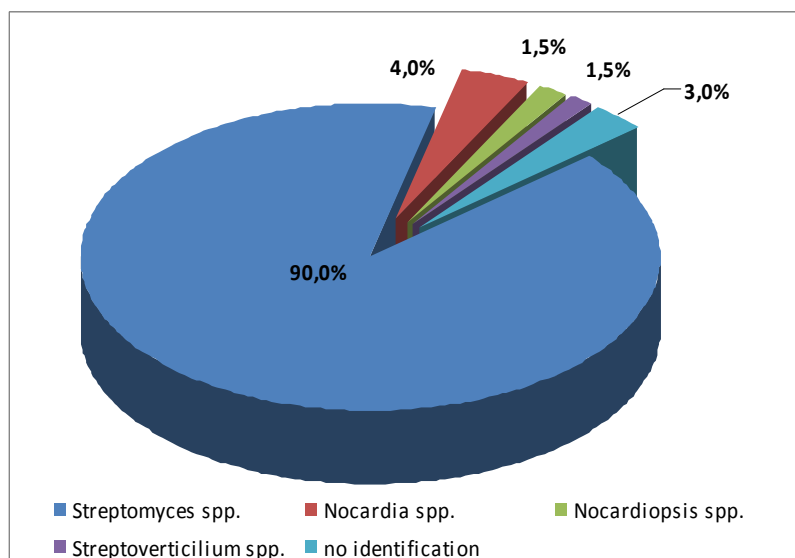


Fig. 2: Identification of actinomycetes genus isolated from foliose lichens.

Determination of Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity analysis of isolated actinomycetes supplied information about the antimicrobial spectrum. Of the 71 actinomycetes tested 80% presented antimicrobial activity in Gelose Block Method. The average of isolated inhibition halo varied from low (halo = 8 at 12 mm), moderate (halo = 13 at 18 mm) to high (halo = 19 at 35 mm) activity. From this, 68% showed higher antimicrobial activity against the microorganisms-test.

The data referring to the antimicrobial activity of the 71 isolated in Gelose Block against the tested microorganism (*E. coli* CCT0547, *P. Aeruginosa* CCT3971, *S. aureus* CCT1352, *L. monocytogene*, *B. subtilis* CCT1359, *M. smegmatis* DPUFPE-71, *C. albicans* CCT0776, *A. niger* CCT1357) demonstrated that the great majority of the actinomycetes expressed activity against *Aspergillus niger* (65%) and *Candida albicans* (56%), (Figure 3).

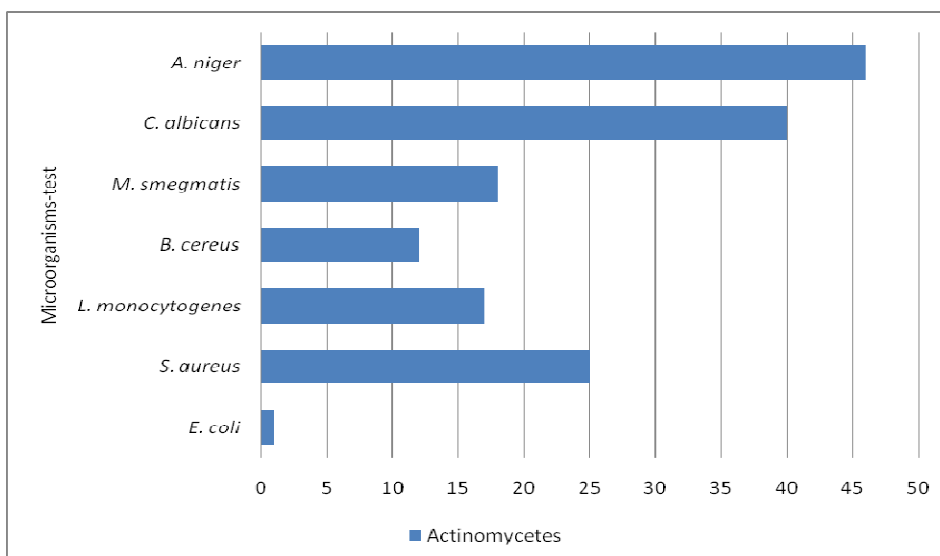


Fig. 3: Test microorganism inhibited by the actinomycetes, in Gelose Block.

However, just only one actinomycete isolated shown activity against *Escherichia coli* and it was not observed antagonism against *Pseudomonas aeruginosa*. Vaara (1993) confirm this results and describes that approximately 90% of the natural antibiotics should not inhibit organisms Gram-negatives. The reasons for this include, mainly, the external membrane presence in this bacteria that count channel that delayed the antibiotic entrance in cell and of the little hydrophilic composts, and the presence of a lipopolissacaride that produce the antibiotic transmembrane diffusion (Lima, 2006; Nikaido, 1996).

In assay for antimicrobial activity in liquid media MPE, 79% of the actinomycetes showed antimicrobial activity against to the tested microorganisms. The most antimicrobial activity was observed against *M. smegmatis* (62%), followed by *S. aureus* (41%). It was not observed activity against *E. coli*. This result is similar to obtained by the Gelose Block Method, also did not verified inhibition halo against the microorganism *P. aeruginosa* (Figure 4).

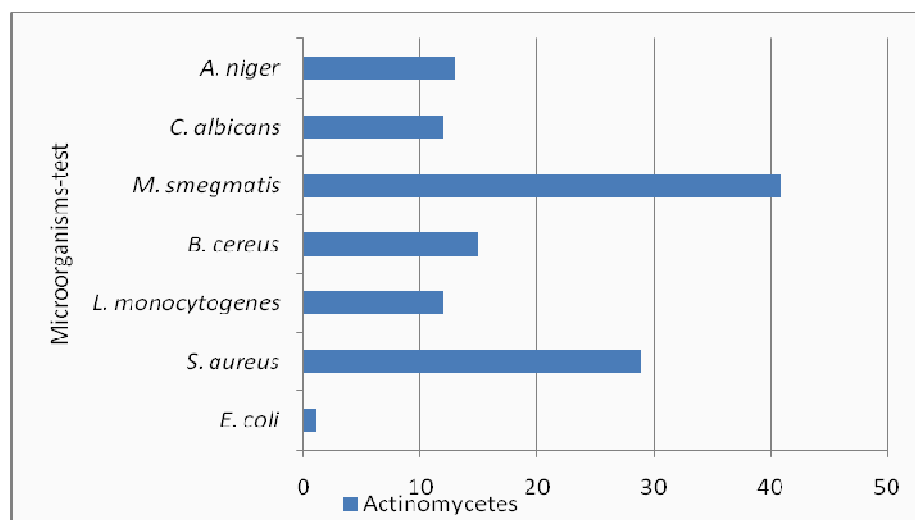


Fig. 4: Test microorganism inhibited by actinomycetes by disk diffusion.

The inhibition halo average varied from low to high activity. From this, 51% of the isolated showed moderate activity and 7% present higher antimicrobial activity.

The media MPE demonstrated to be efficient for the bioactive metabolites production. As Huck et al. (1991) the use of yeasts extract, soy bean and other raw complex material could be utilized as nitrogen source for better production of antibiotics by actinomycetes. Lima (2006) and Ismet et al. (2004) affirmed that the combination of different carbon sources increased the antimicrobial activity in comparison with a only source and that the production increase of bioactive substance was depend of nitrogen source added to the media.

The antimicrobial activity simultaneous detection against filamentous fungi, yeasts and bacteria could suggest the action of more of one antibiotic with different target (González et al., 1999) or the eventual presence of a new antimicrobial substance capable of cross the cell wall, as much bacterial species as to fungal (Sacramento et al., 2004; Tsvetanova; Prince, 2001; Chino et al., 1996).

The screening for new microorganisms capable to produce substances that can action against bacteria and pathogenic fungi is extremelly relevant, but nowadays the application of actinomycetes has changed to more diverse antimicrobials, like against *Plasmodium* sp. (Castillo et al., 2002; 2003; Pullen et al., 2002).

These results suggest that actinomycetes isolated from lichens are promissors organisms for the discovery of new antibiotics, conquering great importance in pharmaceutic industry.

The biotechnological processes are directly related to the diversity of molecules produced by microorganisms, as result of primary and secondary metabolism, and the conservation of their genetic resources. Besides the manufacturing of new pharmaceuticals and bio-industry products, microbial diversity can be widely used in the Amazon region.

Acknowledgements

To the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), UFAM (Universidade Federal do Amazonas) and FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas), for help and finance support for the research development.

References

- Cardinale, M., Pugcglial, A. M., Brube, M.: Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy and Institute of Plant Sciences, Karl-Franzens-University Graz, Graz, Austria. Federation of European Microbiological Societies FEMS. Microbiol Ecol 57. 484–495 (2006).
- Castillo, U. F.; Strobel, G. A.; Ford, E. J.; Hess, W. M.; Porter, H.; Jensen, J. B.; Albert, H.; Robison, R.; Condon, M. A. M.; Teplow, D. B.; Stevens, D.; Yaver, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. Microbiology, v. 148, p. 2675-2685 (2002).
- Castillo, U., Harper, J.K., Strobel, G.A., Sears, J., Alesi, K., Ford, E., Lin, J., Hunter, M.: Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. FEMS Microbiology Letters 224, 183–190 (2003).
- Chino, M., Nishimura, K., Umekita, M., Hayashi, C., Yumazaki, T., Tsuchida, T., Sawa, T., Hamada, M., Takeuchi, T.: Heliquinomycin, a new inhibitor of DNA-helicase, produced by *Streptomyces* sp. MJ929-SF2. I – Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. Journal of Antibiotics 49, 752–757 (1996).
- Dias, B. F. S.: A implantação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Anais do Workshop sobre Biodiversidade perspectiva e oportunidades tecnológicas. Campinas, Brasil (1996).
- González, I., Niebla, A., Lemus, M., González, L., Otero, I., Iznaga, Y., Pérez, M. E., Vallin, C.: Ecological approach of macrolide-lincosamides-streptogramin producing Actinomycetes from Cuban soils. Letters in Applied Microbiology 29, 147–150 (1999).
- González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., Genilloud, O.: Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. FEMS, Microbiol Ecol 54:401-415 Madrid, Spain (2005).

Huck, T. A., Porter, N., Bushell, M. E.: Positive selection of antibiotic-producing soil isolates. *Journal of General Microbiology*, v. 137, p. 2321-2329 (1991).

Ichikawa, T., Ishikura, T., Ozaki, A.: Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiologica*, v. 16, p. 218-224 (1971).

Ismet, A., Vikineswary, S., Paramaswari, S., Wong, W. H., Ward, A., Seki, T., Fiedler, H. P., Goodfellow, M.: Production and chemical characterizations of antifungal metabolites from *Micromonospora* sp. M39 isolated from mangrove rhizosphere soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 523-528 (2004).

Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., ZerizerH.,

HamdikenH., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A. and BoironP. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J. Med. Mycol.* 15, 45–51 (2005).

Lima, V. T.: Isolamento e Atividade Antimicrobiana de Actinomicetos Endofíticos e da Rizosfera de Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.). Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. PE, Brasil (2006).

Matsuura, T.: Ocorrência de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isoaldos de folhas e raízes de feijão Caupi (*Vigna unguiculata*). Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil (1998).

McCarthy, A. J., Williams, S. T.: Methods for studying the ecology of actinomycetes. In: Grigorova, R. and Norris, J. R. *Methods in Microbiology: techniques in microbial ecology*. v. 22. London: Academic (1990).

Muro, M. A., Luchi, M. R.: Preservação de microrganismos. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Toselo” (1989).

Nash, T. H. Lichen Biology. Cambridge, USA, Cambridge University Press led. p.303 (1996).

Nikaido, H.: Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 5853-5859 (1996).

O'leary, W. M.: Practical Handbook of Microbiology, New York, CRC Press. p.688 (1988).

Overbye, K. M., Barret, J. F.: Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discovery Today*. 10(1): 45-52 (2005).

Pullen, C., Schmitz, P., Meurer, K., Bamberg, D. D., Lohmann, S., Franca, S. D. C., Groth, I., Schlegel, B.: New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. *Planta* 216, 162–167 (2002).

Sacramento, D. R, Coelho, R. R. R., Wigg, M. D., Linhares, L. F. T. L., Santos, M. G. M., Semêdo, L. T. A. S., Silva, A. J. R.: Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 225–229 (2004).

Seaward, M. R. D.: Lichen Ecology. Academic Press, Inc. London (1977).

Souza, A. Q. L., Souza, A. D. L., Astolfi-Filho, S., Belém-Pinheiro, M. L., Sarquis, M. I. M., Pereira, J. O.: Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, vol. 34(2), p.185 – 195 (2004).

Staneck, J. L., Roberts, G. D.: Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology*, v. 28, p. 226-231 (1974).

SUDAM (Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia). Rede para conservação e uso de recursos genéticos amazônicos. Grupo de Ciências e Tecnologia. Belém, Brasil (1995).

Tsvetanova, B. C., Prince, N. P. J.: Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of tunicamycin-type antibiotics. *Analytical Biochemistry* 289, 147–156 (2001).

Vaara, M.: Antibiotic-supersusceptible of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 37, p. 2255-2260 (1993).

Waksman, S. A., Woodruff, H. B.: *Actinomyces antibioticus* a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 42, p. 231-249 (1941).

Williams, S. T., Cross. T.: Actinomycetes. *Methods in Microbiology*, v. 6, p. 295-334 (1974).

5. REFERÊNCIAS

- ADRIO, J.L.; DEMAINE, A.L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**. 6 (3): 191-199, 2003.
- ALBAGLI, S., Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. **Parcerias Estratégicas**, no. 12, 2001.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C.W. **Introductory Mycology**. 4th edition. John Wiley and Sons INC, USA. p.869, 1996.
- APPELBAUM, P.C.; JACOBS, M.R. Recently approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**. 8 (5): 510-517, 2005.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: I.S. MELO e J.L. **Ecologia Microbiana**. Editora da EMBRAPA, Jaguariúna, SP. p. 117-137, 1998
- BACH, E. E.; KIMATI, H. Purification and Characterization of Toxins from Wheat Isolates of *Drechslera tritici-repentis*, *Bipolaris bicolor*, and *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. 5(2): 184-199, 1999.
- BOGGS, A.F.; MILLER, G.H. Antibacterial drug discovery: is small pharma the solution? **Clinical Microbiology and Infection**. 10 (suppl. 4): 32-36, 2004.
- BULL, A. T.; HARDMAN, D. J. **Microbial diversity**. Curr. Opin Biotechnology, 2: 421-428, 1991.
- BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the Paradigm Shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 64 (3): 573-606, 2000.
- BUTLER, P.J. Butler, Metabolic regulation in diving birds and mammals, *Respir. Physiol. Neurobiol. Summary Plus*. Cited By in Scopus (18), p.297–315, 2004.
- BUTLER, M.S.; BUSS, A.D. Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**. 71 (7): 919-929, 2006.
- CARDINALE, M., PUGCGLIAL, A. M., BRUBE, M.: **Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities**. Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy and Institute of Plant Sciences, Karl-Franzens-University Graz, Graz, Austria. Federation of European Microbiological Societies FEMS. Microbiol Ecol 57. 484–495 (2006).
- CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TEPLow, D. B.; STEVENS, D.; YAUVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v. 148, p. 2675-2685. 2002.

CASTILLO, U., HARPER, J.K., STROBEL, G.A., SEARS, J., ALES, K., FORD, E., LIN, J., HUNTER, M.: Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters** 224, 183–190 (2003)

CHALIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **PNAS**, 100, p.14555-14561, 2003.

CHIN, Y-W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHRN, A.D.; Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**. 8(2): 239-253, 2006.

CHINO, M., NISHIMURA, K., UMEKITA, M., HAYASHI, C., YUMAZAKI, T., TSUCHIDA, T., SAWA, T., HAMADA, M., TAKEUCHI, T.: Heliquinomycin, a new inhibitor of DNA-helicase, produced by *Streptomyces* sp. MJ929-SF2. I – Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. **Journal of Antibiotics** 49, 752–757. 1996.

CONTI, R. Diversidade e atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos da planta medicinal *Borreria verticillata* (L.) G.F.W. Meyer. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. PE, Brasil. 2007.

CROSS T. Aquatic Actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of Actinomycetes in aquatic habitats. **J Appl Bacteriol** 1981; 50: 397-423. 1981.

DEMAIN, A. Microbial Secondary Metabolism: a New Opportunity for Industry. **Ciba Foundation Symposium**. p.3-23, 1992.

DEMAIN, A.L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**. 18 (1): 26-31, 2000.

DIAS, B. F. S. **A implantação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Anais do Workshop sobre Biodiversidade perspectiva e oportunidades tecnológicas. Campinas, 1996.

FAORO, H. Determinação da Biodiversidade de Archaea e Bacteria da mata atlântica paranaense Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil. 2006.

FENICAL W. **Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource**. *Chem Rev*; 93: 1673-83, 1993.

FLOSS, H.G. Antibiotic biosynthesis: from natural to unnatural compounds. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 27(3): 183-194, 2001.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 189-216, 1983.

GONZÁLEZ, I., AYUSO-SACIDO, A., ANDERSON, A., GENILLOUD, O.: Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS, Microbiol Ecol** 54:401-415 Madrid, Spain (2005)

GULLO, V.P.; HUGHES, D.E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Discovery Today: Technologies**. 2(3): 281-286, 2005.

GUNATILAKA, A.A.L.; Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**. 69(3): 509-526, 2006.

HIGGS, R.E.; ZAHN, J.A.; GIGI, J.D.; HILTON, M.D. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(1): 371-376, 2001.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUCK, T. A., PORTER, N., BUSHELL, M. E.: Positive selection of antibiotic-producing soil isolates. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2321-2329. 1991.

ICHIKAWA, T., ISHIKURA, T., OZAKI, A.: **Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method**. Folia Microbiologica, v. 16, p. 218-224 (1971).

ISMET, A., VIKINESWARY, S., PARAMASWARI, S., WONG, W. H., WARD, A., SEKI, T., FIEDLER, H. P., GOODFELLOW, M.: Production and chemical characterizations of antifungal metabolites from *Micromonospora* sp. M39 isolated from mangrove rhizosphere soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 523-528. 2004.

KITOUNI M., BOUDEMAGH A., OULMI L., REGHIOUA S., BOUGHACHICHE F., ZERIZERH., HAMDIKENH., COUBLE A., MOUNIEE D., BOULAHROUF A. and BoironP. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. **J. Med. Mycol.** 15, 45–51 (2005)

KLEINKAUF, H.; VON DOHREN, H. Biosynthesis of Peptide Antibiotics. **European Journal of Biochemistry**, 192: 1-15, 1990.

KNOWLES, D.J.C. New strategies for antibacterial drug design. **Trends Microbiol.** v. 5, p. 379-382, 1977.

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

LABEDA, D.P. **Isolations of Biotechnological Organisms from Nature**. New York: McGRAW-HILL, 1990.

LEVY, S.B.; MARSHALL, B.; Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**. 10 (suppl. 12): 122-129, 2004.

LI, J. Y; STROBEL, G. A. Jesterone and Hydroxy-Jesterone Antioomycete Cyclohexenone Epoxides From the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry**, 57(2): 262-265, 2001.

LIMA, V. T.: Isolamento e Atividade Antimicrobiana de Actinomicetos Endofíticos e da Rizosfera de Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.). Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. PE, Brasil. 2006.

MCCARTHY, A. J. & WILLIAMS, S. T. Methods for studying the ecology of actinomycetes. In: GRIGOROVA, R. & NORRIS, J. R. **Methods in Microbiology**: techniques in microbial ecology. v. 22. London: Academic, 1990.

MARCELLI, M. P. Biodiversity assessment in lichenized fungi: the necessary naive roll makers. In Bicudo, C.E. de M. & Menezes, N.A. (eds.). **Biodiversity in Brazil: a first approach**. São Paulo, CNPq, p.93-107, 1996.

MATSUURA, T.: Ocorrência de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isoaldos de folhas e raízes de feijão Caupi (*Vigna unguiculata*). Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil. 1998.

MULLER, K., Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 56, 9-16, 2001.

MURO, M. A., LUCHI, M. R.: **Preservação de microrganismos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Toselo” (1989).

NASH, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge, USA, Cambridge University Press led. p.303 (1996)

NASH III, T.H. **Lichen Biology** – Introduction; In Lichen Biology; Nash III, T. H.; Ed; Cambridge University Press, Cambridge; p. 1-315, 1996.

NIKAIDO, H.: Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. **J. Bacteriol.** 178: 5853-5859. 1996.

O'LEARY, W. M.: Practical Handbook of Microbiology, New York, CRC Press. p.688. 1988.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Construindo a História dos Produtos Naturais, v. 7, **MultiCiência** - Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. São Paulo, 2006.

OMURA, S. **Trends** in the search for bioactive microbial metabolites. **J. Industrial Microbiol.** v. 10, p. 135-156, 1992.

OVERBYE, K. M., BARRET, J. F.: Antibiotics: where did we go wrong? **Drug Discovery Today**. 10(1): 45-52, 2005.

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J.. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Adv. Microb. Ecol.**, v. 9, p. 1-55, 1986.

PAREKH, D. B.; ZIEGLER, W.; PARKER, P. J.; Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. **EMBO J.** 19, 496-503, 2000.

PHAFF, H. J. Industrial microorganisms. **Scientific American**, v. 295, p. 52-65, 1991.

PULLEN, C., SCHMITZ, P., MEURER, K., BAMBERG, D. D., LOHMANN, S., FRANCA, S. D. C., GROTH, I., SCHLEGEL, B.: New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. **Planta** 216, 162–167 (2002)

RATTI, R. P.; SERRANO, N. F. G.; HOKKA, C. O.; SOUSA, C. P. **Isolamento e atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos de “pêssego do cerrado”**. Congresso de Pós-Graduação, 4. São Carlos. Anais de Eventos da UFSCar, v. 3, p. 1249, 2007.

REIS, E. **Estatística Descritiva**. Lisboa: Silabo, ed. 4, 1998.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal Basic Microbial**, 40(4): 261-267, 2000.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001

SACRAMENTO, D. R, COELHO, R. R. R., WIGG, M. D., LINHARES, L. F. T. L., SANTOS, M. G. M., SEMÊDO, L. T. A. S., SILVA, A. J. R.: Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 20: 225–229. 2004.

SAMIULLA, DS.; VAIDYANATHAN, V.V.; ARUN, P.C.; BALAN, G.; BLAZE, M.; BONDRE, S.; CHANDRASEKHAR, G.; GADAKH, A.; KUMAR, R.; KHARVI, G.; KIM, H.-O.; KUMAR, S.; MALIKAYIL, J.A.; MOGER, M.; MONE, M.K.; NAGARJUNA, P.; OGBU, C.; PENDHALKAR, D.; RAJA RAO, A.V.S.; VENKATESHWAR RAO, G.; SARMA, V.K.; V.K.; SHAIK, S.; SHARMA, G.V.R.; SINGH, S.; SREEDHAR, C.; SONAWANE, R.; TIMMANNA, U.; HARDY, L.W. Rational selection of structurally diverse natural product scaffolds with favorable ADME properties for drug discovery. **Molecular Diversity**. 9(1-3): 131-139, 2005.

SEAWARD, M.R.D..*Lichen Ecology*. Academic Press, Inc. London. 1977.

SEIDL, P. R. The use of biodiversity for sustainable development: investigation of bioactive products and their commercial applications. **Proceedings of a Workshop**. Manaus, 1993.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; BELÉM-PINHEIRO, M. L. SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens benth***. . Acta Amazônica VOL. 34(2) 2004: 185 – 195

STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L.; PAINTER, P.R. **The Microbial World**. 5.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1980.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, vol. 18, no. 4, p. 382-385, 1998.

STANECK, J. L., ROBERTS, G. D.: **Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography**. *Applied Microbiology*, v. 28, p. 226-231 (1974).

SUDAM. Rede para conservação e uso de recursos genéticos amazônicos. Grupo de Ciências e Tecnologia - Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia. Belém, 1995.

TERKINA, I. A.; PARFENOVA, V. V., AHN, T. S. Antagonistic Activity of Actinomycetes of Lake Baikal. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 2006, Vol 42, no.2, pp 173-176.

TRILLI, V.; MICHILINI, V.; MONTOVANI, V.; PIRT, S.J. Development of the agar disk method for the rapid selection of cephalosporim producers with improved yields. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 13(1): 7-13, 1978.

TSVETANOVA, B. C., PRINCE, N. P. J.: Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of tunicamycin-type antibiotics. **Analytical Biochemistry** 289, 147–156. 2001.

UJIKAWA, K.; Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 39, n. 2, abr.jun., 2003.

VAARA, M.: Antibiotic-supersusceptible of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 2255-2260.1993.

WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS-Microbiology Letters**, 193: 249-253. 2000.

WAKSMAN, S. A., WOODRUFF, H. B.: **Actinomyces antibioticus a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria**. *Journal of Bacteriology*, v. 42, p. 231-249 (1941)

WEIST, S.; SUSSMUTH, R.D. Mutation biosynthesis – a tool the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 68(2): 140-150, 2005.

WILLIAMS, S. T. & CROSS. T. Actinomycetes. **Methods in Microbiology**, v. 6, p. 295-334, 1974.

WOESE, C. R. Prokariotic systematics: The evolution of a science. In: BALOWS, A., TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHEIFER, K. M. **The Prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992.

YONEYAMA, H.; KATSUMATA, R, R.; Antibiotic resistance in bacteria and its Future for novel antibiotic development. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 70 (5): 1060-1075, 2006.

6. ANEXOS

- Meios para Isolamento

- ❖ Ágar Extrado de Levedura – Extrato de Malte (ISP-2)

Extrato de levedura.....	4,0 g
Extrato de malte.....	10,0 g
Dextrose.....	4,0 g
Ágar.....	20,0 g
Água.....	1000 mL

pH 7,3

- ❖ Ágar Extrado de Levedura – Extrato de Malte – Amido (ISP-2A)

Amido.....	10,0 g
Extrato de levedura.....	4,0 g
Extrato de malte.....	10,0 g
Dextrose.....	4,0 g
Ágar.....	20,0 g
Água.....	1000 mL

pH 7,3

- ❖ Caseína-Amido Ágar (CAA)

Amido.....	10,0 g
KNO ₃	2,0 g
NaCL.....	2,0 g
MgSO ₄	2,0 g
MgSO ₄	0,05 g
CaCO ₄	0,02 g
FeSO ₄	0,01 g
Ágar.....	25,0 g
Água destilada.....	1000 mL

pH 7,0 – 7,4

❖ Rafinose – Histidina Agar (RHA)

Rafinose	10,0 g
L-histidina.....	1,0 g
MgSO ₄	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
Ágar.....	25,0 g
Água destilada.....	1000 mL

pH 7,0 – 7,4

• Meio para Atividade Antimicrobiana em Meio Sólido (ISP-2A)

Amido.....	10,0 g
Extrato de levedura.....	4,0 g
Extrato de malte.....	10,0 g
Dextrose.....	4,0 g
Ágar.....	20,0 g
Água destilada.....	1000 mL

pH 7,3

• Meio para Atividade Antimicrobiana em Meio Líquido (MPE)

Glicose.....	20,0 g
Farinha de Soja.....	20,0 g
NaCL.....	5,0 g
CaCO ₃	2,0 g
Água destilada.....	1000 mL

pH 7,0 – 7,4

• Meios para Identificação dos actinomicetos

❖ Extrato de levedura - Extrato de malte - Ágar (ISP-2)

Extrato de levedura	4,0 g
Extrato de malte	10,0 g
Dextrose	4,0 g
Ágar	20,0 mL
Água destilada	1000 mL

pH 7,3

❖ Ágar Farinha de Aveia (ISP-3)

Solução de traços de sais:

Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Cloreto manganoso ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Água destilada	100,0 mL
Farinha de aveia	20,0 g
Solução de traços de sais	1,0 g
Ágar	18,0 g
Água destilada	1000 mL

pH 7,2

❖ Ágar Sais inorgânicos - Amido (ISP-4)

Solução de traços de sais:

Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Cloreto manganoso ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Água destilada	100,0 mL

Solução I: Amido	10,0 g
Água destilada	500 mL

Solução II: Fosfato hidrogeno dipotássico (K_2HPO_4)	1,0 g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
Cloreto de sódio (NaCl)	1,0 g

Sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	2,0 g
Carbonato de cálcio (CaCO_3)	2,0 g

Solução de traços de sais	1,0 mL
Ágar	20,0 g
Água destilada	500 mL

pH 7,0 - 7,

❖ Glicerol – Asparagina - Ágar (ISP-5)

L-asparagina (base anidra).....	1,0 g
Glicerol.....	10,0 g
K ₂ HPO ₄ (base anidra).....	1,0 g
Água destilada	1000 mL

Solução de traços de sais (ISP-3)	1,0 mL
Ágar	15,0g
pH 7,4	

❖ Ágar (ISP-6)

Peptona.....	15,0 g
Protease Peptona.....	5,0 g
Citrato de Ferro e Amônio.....	0,5 g
R ₂ HPO ₄	1,0 mL
Tiosulfato de Sódio (S ₂ O ₃ Na ₂).....	0,08 g
Extrato de Levedura.....	1,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL
pH 7,3	

❖ Tirosina - Ágar (ISP-7)

Glicerol.....	15,0 g
L-tirosina.....	0,5 g
L-asparagina.....	1,0g
R ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g
NaCl.....	0,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,01 g
Água destilada	1000 mL
Solução de traços de sais (ISP-3).....	1,0 mL
Ágar.....	20,0 g
pH 7,2 – 7,4	