

SIMONE ICHIWAKI

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE
ACTINOMICETOS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ÁGUA E SEDIMENTO
DA BACIA DO RIO TIETÊ.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla
Maldonado

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD);

São Paulo
2017

RESUMO

ICHIWAKI S. **Caracterização e identificação de linhagens de actinomicetos isoladas de amostras de água e sedimento da bacia do rio Tietê.** 2017. 142 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A bacia do rio Tietê, compreende a maior região hidrográfica do Estado de São Paulo e parte de sua extensão se encontra em regiões da Mata-Atlântica, famosa por sua riqueza em biodiversidade. A microbiota de ambientes de água doce, além de muito diversificada, é pouco explorada e pode representar uma fonte importante de novos microrganismos produtores de moléculas bioativas. Os actinomicetos são bactérias conhecidas pela produção de uma grande variedade de moléculas bioativas, e são frequentemente descritas em ambientes aquáticos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e identificar linhagens de actinomicetos isoladas de amostras de água e sedimento da bacia do rio Tietê. Nove linhagens de actinomicetos foram isoladas de amostras coletadas ao longo da bacia do rio Tietê, 6 pertencentes ao gênero *Streptomyces* e 3 ao gênero *Micromonospora*. Foram realizadas as caracterizações fenotípicas dos isolados e a identificação em nível de espécie por meio de análise filogenética (MLSA) e testes de perfil taxonômico. Os resultados obtidos indicaram que 3 isolados (identificadas como NBS 10/01, NBS 14/02 e NBS 11/28) pertencem a novas espécies de actinomicetos. Os demais isolados foram identificados como membros das espécies *S. bingchengensis* (NBS 14/10), *S. lavendulae* (NBA 43/10), *S. humi* (NBA 51/00) e *S. gancidicus* (NBA 55/19); *M. sediminicola* (NBS 11/29) e *M. tulbaghiaie* (NBA 65/00). Foram realizadas triagens para verificar a produção de enzimas hidrolíticas e de metabólitos secundários com atividades antifúngica e antibacteriana, além da produção de pigmentos solúveis e melaninas. Todos as linhagens de actinomicetos foram capazes de hidrolisar ao menos um dos substratos lignocelulósicos testados. Todos os isolados do gênero *Streptomyces* apresentaram atividade antifúngica. Com exceção de uma linhagem de *Streptomyces* e uma de *Micromonospora*, todos os isolados apresentaram atividade antibacteriana. Quatro linhagens de *Streptomyces* também apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias multiresistentes a antibióticos. Os genomas dos 9 isolados foram sequenciados e anotados pelas ferramentas RAST e antiSMASH para realizar a traigem *in silico* do potencial biotecnológico das linhagens. Os principais grupos de *clusters* identificados nas linhagens foram: PKS do tipo I, II e III, sideróforos, terpenos, NRPS, ectoínas, fenazinas, lantipeptídeos, butirolactonas e bacteriocinas. Os genomas dos isolados de *Streptomyces* apresentaram maior quantidade e diversidade de *clusters* de genes biosintéticos em relação aos genomas de *Micromonospora*. O presente trabalho permitiu isolar e caracterizar linhagens de actinomicetos de um ambiente aquático pouco explorado e considerado um *hotspot* para a biodiversidade. Todos os isolados deste estudo apresentaram, grande potencial biotecnológico, seja produzindo metabólitos secundários de atividade antimicrobiana, enzimas lignocelulolíticas, pigmentos solúveis ou melaninas.

Palavras-chave: *Streptomyces*. *Micromonospora*. Novas espécies. Potencial biotecnológico. Bioinformática

ABSTRACT

ICHIWAKI. S. **Characterization of actinomycetes isolated from water and sediment samples from Tietê River Basin.** 2017. 142 p. Ph.D Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The Tietê river basin is the largest hydrographic region of São Paulo and part of its extension lies in the Atlantic Forest, a famous for its biodiversity richness. The microbiota of freshwater environments is highly diversified and very underexplored, and may represent an important source of new microorganisms that are bioactive-molecules producers. Actinomycetes are bacteria known to produce a wide variety of bioactive molecules, and are often described in aquatic environments. Thus, the aim of this study was to characterize and identify actinomycetes strains isolated from water and sediment samples from the Tietê river basin. Nine strains of actinomycetes were isolated along the Tietê river basin, 6 *Streptomyces* strains and 3 *Micromonospora* strains. The phenotypic characterization of the isolates and the identification at the specie level were performed. The identification was performed by phylogenetic analysis (MLSA) and taxonomic profile tests. The results showed that 3 isolates (identified as NBS 10/01, NBS 14/02 and NBS 11/28) are new species of actinomycetes. The remaining isolates were identified as *S. bingchenggensis* (NBS 14/10), *S. lavendulae* (NBA 43/10), *S. humi* (NBA 51/00) and *S. gancidicus* (NBA 55/19); *M. sediminicula* (NBS 11/29) and *M. tulbaghiaie* (NBA 65/00). Screenings were performed to verify the production of hydrolytic enzymes and secondary metabolites with antifungal and antibacterial activities, as well as the production of soluble pigments and melanins. All actinomycete strains could hydrolyse at least one of the lignocellulosic substrates. All isolates of the genus *Streptomyces* showed antifungal activity. Except for one *Streptomyces* strain and one of *Micromonospora* strain, all isolates showed antibacterial activity. Four *Streptomyces* strains showed antibacterial activity against multiresistant bacteria. The genomes of all isolates were sequenced and annotated by RAST and antiSMASH tools to perform the *in silico* screening of biotechnological potential. The main groups of clusters identified in the genomes were: type I, II and III PKS, siderophores, terpenes, NRPS, ectoins, phenazines, lantipeptides, butyrolactones and bacteriocins. The genome of *Streptomyces* isolates showed a higher quantity and diversity of clusters than *Micromonospora* genomes. The present study allowed isolating and characterizing actinomycete strains from an underexplored aquatic environment, considered a biodiversity hotspot. All the isolates in this study had a high biotechnological potential, either producing secondary metabolites of antimicrobial activity, lignocellulolytic enzymes, soluble pigments or melanins.

Keywords: *Streptomyces*. *Micromonospora*. New species. Biotechnological potential. Bioinformatics.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bacia do rio Tietê

A bacia do rio Tietê, compreende a maior região hidrográfica em área de drenagem do Estado de São Paulo e apresenta aproximadamente 73.400 km². Sua malha hidrográfica é composta pelo rio Tietê e seus afluentes, além de outros rios como o Piracicaba, Capivari, Sorocaba, Jacaré-Pepira e Batalha. O rio Tietê é o mais extenso do território paulista, percorrendo aproximadamente 1.100 Km, desde sua nascente localizada no município de Salesópolis, até desaguar no rio Paraná, divisa com o estado de Mato Grosso do Sul. Ao contrário da maioria dos rios, o sentido de suas águas segue do litoral para o interior do estado, passando por diversos municípios paulistas (SÃO PAULO (ESTADO), 2009). Desempenha um importante papel no abastecimento e produção de energia elétrica para a população, possuindo mais de 10 hidrelétricas ao longo de sua extensão e de seus afluentes (MORTATTI et al., 2013). A nascente do rio Tietê localiza-se em uma área preservada da Serra do Mar e parte de sua extensão encontra-se em unidades de conservação que ainda guardam riquezas do bioma da Mata-Atlântica; um dos cinco mais importantes *hotspots* em biodiversidade do mundo e também um dos mais ameaçados por fatores antropogênicos (BRUCE et al., 2010; MYERS et al., 2000).

A região da Bacia do Tietê é subdividida em 6 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI), que são divisões definidas para efeito de planejamento e gerenciamento dos corpos d'água (Figura 1). As Unidades de Gerenciamento que fazem parte da Bacia do Rio Tietê são: UGRHI 05 – Piracicaba/Capivari/Jundiaí (PCJ), UGRHI 06 – Alto Tietê, UGRHI 10 – Tietê/Sorocaba, UGRHI 13 – Tietê/Jacaré. UGRHI 16 – Tietê/Batalha e UGRHI 19 – Baixo Tietê (SÃO PAULO (ESTADO), 2012).

As UGRHIs da Bacia do Rio Tietê possuem características socioeconômicas distintas entre si. As UGRHIs 05 e 06, caracterizam-se principalmente pela forte atividade industrial e pelos grandes núcleos urbanos, que contribuem com grande parte do volume de contaminantes que comprometem a qualidade da água. Dentro da UGRHI 6 está localizada a Região Metropolitana de São Paulo, que conta com um dos mais diversificados parques industriais da América Latina. Além disso, a intensa urbanização destas regiões contribui com uma alta carga de poluentes de origem doméstica (MIDAGLIA, 2011; SÃO PAULO (ESTADO), 2017). A UGRHI 10 também

se destaca por sua atividade industrial em diversas áreas, como têxtil, celulose e papel, alimentícia, sucroalcooleira e de refinaria de petróleo. As UGRHIs 13, 16 e 19 são menos industrializadas e encontram-se em estágio de expansão de sua agroindústria. Na UGRHI 13 ocorre o predomínio da agroindústria de cana-de-açúcar, eucalipto e laranja, sendo esta última a principal responsável pelo consumo de água da região. Nas UGRHIs 16 e 19 o enfoque econômico está em atividades relacionadas à agropecuária, como o cultivo da cana-de-açúcar e pecuária de corte .

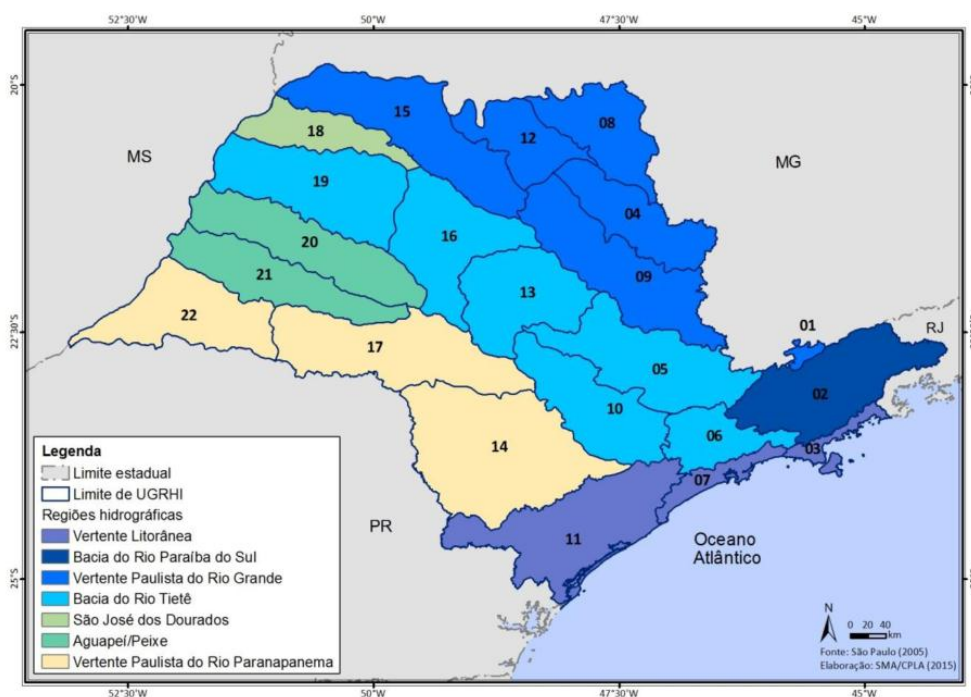


Figura 1 - Bacias Hidrográficas do estado de São Paulo e Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI). A Bacia do Rio Tietê é composta por 6 UGRHIs: UGRHI 05 – Piracicaba/Capivari/Jundiaí (PCJ), UGRHI 06 – Alto Tietê, UGRHI 10 – Tietê/Sorocaba, UGRHI 13 – Tietê/Jacaré. UGRHI 16 – Tietê/Batalha e UGRHI 19 – Baixo Tietê. Fonte: São Paulo (Estado), 2015.

As características socioeconômicas das UGRHIs podem influenciar o Índice de Qualidade das Águas (IQA) destas regiões. O IQA é um índice que incorpora nove variáveis para a avaliação da qualidade das águas, tendo como determinante principal a sua utilização para abastecimento público. As variáveis utilizadas pelo IQA são: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, coliformes termotolerantes, nitrogênio total, fósforo total, resíduo total e turbidez. (SÃO PAULO (ESTADO), 2014).

De acordo com as análises de IQA da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), a UGRHI 06 apresenta boa qualidade de águas nas proximidades

com a nascente do rio Tietê e uma acentuada queda de qualidade quando o rio atravessa a Região Metropolitana de São Paulo, onde passa a ser classificada como ruim ou péssima. Ainda segundo esta análise, o IQA apresenta melhora consistente após o reservatório de Barra Bonita, localizado na UGRHI 10, sendo classificado como bom em algumas cidades. Nas UGRHIs 16 e 19, trecho final do rio Tietê, o IQA já é classificado como bom ou ótimo (SÃO PAULO (ESTADO), 2014). Com estes dados observa-se a capacidade de recuperação que o rio apresenta ao longo de seu percurso. No entanto, a falta de tratamento adequado dos resíduos industriais e esgotos domésticos causam sérios problemas ambientais, especialmente ao longo da Região Metropolitana de São Paulo. Em consequência, ocorre a deterioração da qualidade da água e o impacto na fauna, flora e comunidade microbiana associadas a este ecossistema (MORTATTI et al., 2013).

1.2 Biodiversidade microbiana em ambientes de água doce

A comunidade microbiana desempenha um papel fundamental na manutenção dos ambientes de água doce, reciclando compostos orgânicos e atuando nos ciclos biogeoquímicos desses ecossistemas (GIBBONS et al., 2014). A diversidade de microrganismos nestes ambientes pode ser especialmente elevada devido à mistura que ocorre entre as comunidades microbianas aquática e a terrestre. Táxons típicos do solo são frequentemente encontrados em ambientes de água doce, sendo muitas vezes introduzidos pela ação das chuvas (SILVA, 2013). Entre os Filos mais comumente encontrados nestas comunidades estão as Proteobacteria (α , β e γ), Bacteroides, Cyanobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia e Planctomycetes (STALEY et al., 2013).

A biodiversidade destes ambientes pode ser facilmente impactada por poluentes como herbicidas, pesticidas, metais pesados, excesso de matéria orgânica e até mesmo pela introdução de bactérias não nativas ao ambiente. Estes fatores podem modificar significativamente a estrutura da comunidade microbiana, tanto na coluna d'água quanto no sedimento dos rios, alterando a presença ou abundância de táxons específicos neste ecossistema (STALEY et al., 2013). Estudos têm demonstrado que as comunidades microbianas são extremamente sensíveis a mudanças físicoquímicas que ocorrem no sedimento de ambientes de água doce, o

que pode ser utilizado como indicador de degradação ambiental (GIBBONS et al., 2014; RAMSEY et al., 2005) .

Apesar da grande diversidade microbiana que os ambientes de água doce apresentam, ainda pouco se sabe a respeito de suas comunidades em comparação àquelas de ambientes terrestres. Nos últimos anos, a percepção do valor destes habitats vem crescendo e estes passaram a ser considerados como possíveis fontes de microrganismos biotecnologicamente interessantes (RIFAAT, 2003). A constante exploração dos ambientes terrestres, por muitos anos, foi responsável pela descoberta de microrganismos produtores de moléculas bioativas, como enzimas e metabólitos secundários. Porém, com o recorrente isolamento de compostos já conhecidos, o foco dos estudos mais recentes tem sido a exploração de ambientes pouco explorados ou inexplorados, especialmente, ambientes aquáticos marinhos e de água doce (RIZVI; KAMBLE; KADAM, 2012). Microrganismos descobertos nestes ambientes têm sido descritos como produtores de novas moléculas antibióticas ou enzimas hidrolíticas (ENCHEVA-MALINOVA et al., 2014; MOHAN et al., 2013; SAADOUN; GHARAIBEH, 2002). O isolamento de novos microrganismos, e novas moléculas produzidas por eles, é de grande interesse para o desenvolvimento de novos fármacos, especialmente frente à emergência de linhagens de patógenos multirresistentes à antibióticos (SINGH; SHARMA; TALUKDAR, 2014).

1.3 Actinomicetos

Um dos táxons frequentemente encontrados em ambientes de água doce, são os actinomicetos (SILVA, 2013).

Os actinomicetos são bactérias filamentosas ou em forma de bastão, esporulantes, Gram-positivas e geralmente aeróbias, pertencentes ao Filo Actinobacteria, Classe Actinobacteria. Caracterizam-se por apresentar alto conteúdo de guanina e citosina (G+C) no DNA, sendo sempre superior a 55%. São altamente diversos morfologicamente, podendo variar entre micrococos, bastões pleomórficos, filamentos ramificados ou não ramificados, o que sempre está relacionado com suas estratégias reprodutivas. As hifas se organizam em micélios e possuem aparência semelhantes às dos fungos. Podem apresentar desenvolvimento vegetativo por micélio substrato (micélio submerso no substrato) e, em alguns gêneros, formação de micélios aéreos e esporos assexuais, o que levou estas bactérias a serem inicialmente

classificadas como fungos (Figura 2) (FLÄRDH; BUTTNER, 2009). No entanto, sua posição dentro do domínio Bacteria foi estabelecida devido a características como a ausência de núcleo, a sensibilidade a fagos e a antibióticos antibacterianos, e a falta de esteróis na parede celular (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967). Outra característica peculiar de alguns actinomicetos é a capacidade de sintetizar a geosmina, um terpeno volátil responsável pelo odor característico da terra molhada (CHAUDHARY et al., 2013).

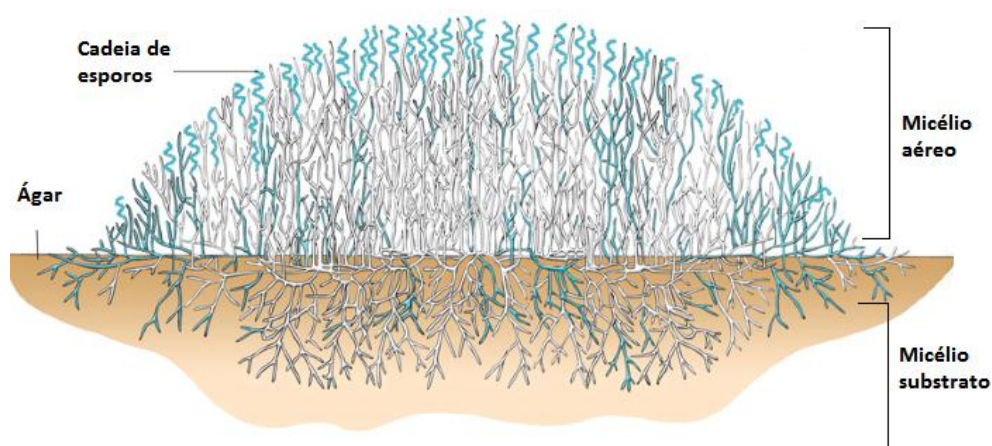


Figura 2 - Esquema de colônia de actinomiceto com desenvolvimento micelar aéreo e de micélio substrato. Em azul, pode-se observar a formação de cadeia de esporos nas hifas aéreas. Fonte: Adaptação de Li et al. (2016)

O grupo dos actinomicetos reúne tanto bactérias mortais, como *Mycobacterium tuberculosis*, quanto bactérias importantes na produção de fármacos antibióticos, como as bactérias do gênero *Streptomyces* (DOROGHAZI; METCALF, 2013). São bactérias encontradas amplamente na natureza, mas são primariamente habitantes do solo, onde desempenham um importante papel na ciclagem da matéria orgânica. São capazes de realizar uma grande variedade de processos metabólicos e de produzir distintos compostos bioativos. Esta plasticidade metabólica lhes permite utilizar diferentes fontes de carbono e energia, encontradas nos mais diversos ecossistemas (BHAT et al., 2013). A quantidade e diversidade de actinomicetos isolados de um determinado ecossistema são influenciadas diretamente por fatores como temperatura, pH, quantidade de matéria orgânica, aeração, presença de atividade agrícola ou industrial na região, entre outros. Representantes de actinomicetos já foram descritos em ambientes aquáticos, sedimentos marinhos e de lagos, ambientes extremos como o solo da Antártica, solos de desertos e até mesmo

em simbiose com plantas leguminosas (CARRO et al., 2012; ENCHEVA-MALINOVA et al., 2014).

A característica mais marcante destes microrganismos é a capacidade de produzir uma grande variedade de compostos bioativos. Muitos destes produtos naturais possuem propriedades antibióticas, sendo importantes recursos na produção de medicamentos (MUTHU et al., 2013). Actinomicetos de diversos ambientes têm sido descritos como produtores de compostos bioativos, no entanto, apenas nas últimas décadas os estudos de actinomicetos de ambientes aquáticos ganharam importância, resultando na descoberta de novas espécies e novas moléculas (NINGTHOUJA; SANASAM; NIMAICHAND, 2009; RIFAAT, 2003; RIZVI; KAMBLE; KADAM, 2012).

1.4 Potencial biotecnológico dos actinomicetos

Os actinomicetos são importantes economicamente e biotecnologicamente devido à ampla variedade dos compostos bioativos que produzem. Os maiores produtores de biomoléculas comercialmente importantes são encontrados nos gêneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, e *Actinoplanes* (CHAUDHARY et al., 2013). Estes actinomicetos são conhecidos por sintetizar metabólitos secundários de ação antimicrobiana, antitumoral, imunossupressora, antioxidante e diversas enzimas de aplicação industrial (BHAT et al., 2013). Devido a estas potencialidades, a triagem, isolamento e caracterização de actinomicetos têm sido áreas de intenso estudo no mundo inteiro nas últimas décadas.

1.4.1 Enzimas hidrolíticas

Os actinomicetos são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam macromoléculas complexas, como por exemplo quitina, celulose, lignocelulose, caseína, amido, entre outros (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Esta característica os torna capazes de utilizar as mais diversas fontes de carbono e energia, o que lhes confere uma importante vantagem competitiva em relação a outros microrganismos que disputam o mesmo nicho (BHAT et al., 2013)

Entre as formas de carbono fixado presentes na natureza, a celulose é a mais abundante. A celulose é o principal polissacarídeo constituinte da parede celular

vegetal. É um polímero de cadeia longa, composto por monômeros de D-glicose unidos por meio de ligações β -1,4-glicosídicas (GRIGOREVSKI DE LIMA et al., 2005). Muitos microrganismos conseguem hidrolisar parcialmente a celulose, mas apenas grupos restritos de microrganismos são capazes de hidrolisá-la completamente, gerando glicose. Isto é possível através da produção de múltiplas enzimas hidrolíticas que atuam em sinergismo (DE MENEZES et al., 2008). No ambiente terrestre, a celulose encontra-se geralmente embebida por uma matriz de lignina formando um tecido vegetal duro e fibroso, mais difícil de degradar. Fungos e actinomicetos podem acessar esta celulose, graças ao crescimento de suas hifas que penetram nos tecidos vegetais mais resistentes (LEE et al., 2002; MCCARTHY, 1987). Poucos estudos relatam a contribuição dos microrganismos na degradação de celulose em ambientes aquáticos, mas sabe-se que alguns gêneros de actinomicetos, como *Micromonospora*, desempenham este papel em ecossistemas lacustres (DE MENEZES et al., 2008).

As três principais enzimas envolvidas na hidrólise da celulose são a endoglicanase (endo-1,4- β -D-glicanase, EC 3.2.1.4), celobiohidrolase (exo-1,4- β -D-glicanase, EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (1,4- β -D-glicanase, EC 3.2.1.21). A endoglicanase cliva as ligações β -1,4-glicosídicas que existem no interior da molécula de celulose, a celobiohidrolase remove unidades de celobiose das extremidades da molécula de celulose e a β -glicosidase divide as moléculas de celobiose em duas unidades de glicose (GRIGOREVSKI DE LIMA et al., 2005).

Além da celulose, a parede celular vegetal contém outros polissacarídeos, as hemiceluloses e pectinas. As hemiceluloses são polissacarídeos complexos de estrutura altamente variável. Tem por função fortalecer a parede celular vegetal interagindo com a celulose e, em alguns casos, com a lignina. A xilana, é a mais abundante das hemiceluloses, e é composta por monômeros de xilose, uma pentose (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). As principais enzimas que participam de sua hidrólise são as endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) e β -xilosidases (EC 3.2.1.37), que atuam juntas quebrando internamente a cadeia principal da xilana. Um conjunto de enzimas auxiliares atuam na hidrólise das cadeias laterais, como por exemplo α -glicuronidase (EC 3.2.1.131) e acetil-xilana-esterase (3.1.1.72) (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005).

As pectinas são polissacarídeos compostos por macromoléculas glicosídicas de alto peso e um dos principais componentes da lamela média nas plantas, uma fina camada extracelular adesiva que se encontra entre a parede celular vegetal e células jovens adjacentes. As enzimas que degradam estes polissacarídeos são as

pectinases, que podem agir rompendo as ligações entre as moléculas (hidrolases e liases) ou promovendo reações de desesterificação (esterases). Estas enzimas são há muito tempo utilizadas na indústria alimentícia para aumentar a produção e clarificar sucos de frutas (PEDROLLI et al., 2009).

Enzimas lignocelulolíticas são comumente utilizadas em vários setores, incluindo alimentício, têxtil, na produção de papel, bebidas, detergentes, na agricultura e alimentação animal. Linhagens selvagens e mutantes do fungo filamentoso *Trichoderma* spp., tem sido por muito tempo consideradas as melhores produtoras destas enzimas. No entanto, a sua produção é muito custosa e uma enorme quantidade é requerida para hidrólise em escala industrial (AMORE et al., 2012). Por esta razão, microrganismos capazes de produzir estas enzimas a partir de substratos de baixo custo ou a partir de resíduos industriais são frequente foco de estudos (GRIGOREVSKI DE LIMA et al., 2005). Outra aplicação para estas enzimas é a produção de bioetanol a partir do resíduo de matérias primas vegetais, como bagaço da cana-de-açúcar. (HIRSCH; VALDÉS, 2010). Bactérias geralmente possuem melhor taxa de crescimento que fungos, sendo bons candidatos para a produção de enzimas hidrolíticas. Diversas linhagens de actinomicetos do gênero *Streptomyces* têm sido estudadas e descritas como boas produtoras de enzimas lignocelulolíticas termoestáveis (AMORE et al., 2012; CHATER et al., 2010; GRIGOREVSKI DE LIMA et al., 2005; PRASAD; SINGH; BEDI, 2013).

1.4.2 Metabólitos secundários

Metabólitos secundários são compostos orgânicos de baixo peso molecular, quimicamente e taxonomicamente diversos, que não estão diretamente envolvidos nas funções de crescimento, desenvolvimento e reprodução da célula ou organismo produtor. Sua função não é essencial para a sobrevivência, ao contrário dos metabólitos primários (aminoácidos e nucleotídeos, por exemplo) que são moléculas diretamente envolvidas no crescimento, desenvolvimento e reprodução (HASANI; KARIMINIK; ISSAZADEH, 2014). Apesar de não serem essenciais, são importantes para seus produtores como moléculas protetoras, sinalizadoras, reguladoras, ou agindo como antibióticos ou toxinas. Ainda assim, muitos metabólitos secundários permanecem com suas funções desconhecidas (DEMAIN; ADRIO, 2008).

As características mais marcantes dessas moléculas são a incrível variedade estrutural e a frequente presença de atividades biológicas. Antigamente, apenas os metabólitos secundários que tinham ação antimicrobiana, antiviral ou antitumoral eram denominados antibióticos. Atualmente esta denominação se estendeu a todos os metabólitos secundários de origem microbiana, que regulam processos de crescimento, replicação e/ou exibem algum tipo de resposta regulatória (estímulo, inibição ou regulação) em células de procariotos ou eucariotos, em nível bioquímico e em mínimas concentrações (BÉRDY, 2005).

Entre os metabólitos secundários mais estudados e de maior relevância estão os policetídeos (PK). Os policetídeos são uma grande classe de produtos naturais que possuem ampla diversidade estrutural e funcional. Muitas das moléculas bioativas sintetizadas por actinomicetos se enquadram nesta classe, como por exemplo as tetraciclinas (antibacteriano e antitumoral), a daunorrubicina (antitumoral), a rapamicina (imunossupressor), a lovastatina (regulador de colesterol) e melaninas (pigmentos antioxidante). Além de serem sintetizadas por bactérias, os policetídeos podem ser produzidos por fungos e plantas (SHEN, 2003).

São sintetizados através da condensação de unidades de acil (geralmente um acetil) e malonil que dão origem a um esqueleto de carbono para a futura molécula de policetídeo. Desta forma, pequenas moléculas acil são adicionadas nesta cadeia em crescimento e são modificadas por um conjunto de enzimas. Esta via forma diversas estruturas de policetídeos com diferentes atividades biológicas (HERTWECK, 2009).

As enzimas responsáveis pela síntese de policetídeos são as policetídeo sintases (PKS), que podem ser de três tipos: as PKSs do tipo I, são enzimas multifuncionais que são organizadas em domínios, cada um com uma função. Os domínios não interagem entre si e atuam separadamente para a catálise de um ciclo de alongação da cadeia do policetídeo. As PKSs do tipo II, são multienzimas complexas que atuam juntas em um *set* único de funções e são encontradas em bactérias e plantas. As PKSs tipo III, são enzimas homodiméricas, ou seja, compostas por duas cadeias peptídicas idênticas. (SHEN, 2003).

Outra classe de metabólitos secundários de grande importância são os peptídeos não-ribossomais (NRP). Estas moléculas possuem amplo espectro de atividades biológicas e farmacêuticas, que incluem ação antimicrobiana, imunomoduladora e antitumoral. Alguns exemplos de fármacos derivados destas moléculas são a ciclosporina, um imunossupressor utilizado em pacientes

transplantados; a daptomicina, um antibacteriano usado em casos de infecções por bactérias Gram-positivas multi-resistentes e os β -lactâmicos, a classe mais famosa de antibióticos. São sintetizadas por complexos multienzimáticos chamados sintetase de peptídeo não ribossomal (NRPS).

Também podemos citar os sideróforos, que são pequenas moléculas de elevada afinidade com ferro produzidas por microrganismo para auxiliar na captação de íons ferro. Além de seu papel importante para as bactérias, os sideróforos vem sendo aplicados na indústria de biofármacos, como um mediador da entrada de antibióticos nas células de patógenos (SAHA et al., 2013).

As fenazinas, são metabólitos secundários produzidos unicamente por bactérias. São estudadas devido seus impactos sobre interações bacterianas, contribuindo para formação de biofilme e aumentando sua sobrevivência. Têm sido utilizadas em fármacos de ação antimicrobiana de amplo espectro e são componentes centrais de compostos antitumorais. Gêneros bacterianos produtores de fenazinas incluem *Sorangium*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea agglomerans*, *Vibrio*, *Pelagibacter* e actinomicetos como *Nocardia* e, especialmente, *Streptomyces* (PIERSON; PIERSON, 2010).

Ectoínas são moléculas protetoras, que têm a propriedade de mitigar os efeitos deletérios causados por estresse por calor, congelamento, dessecação, elevada salinidade, radiação, ureia e outros agentes desnaturantes. Estas moléculas agem sobre a integridade das proteínas, ácidos nucleicos e membranas celulares. Vem sendo estudadas por serem potenciais candidatos a moléculas terapêuticas contra diversas doenças, incluindo o mal de Alzheimer. As ectoínas inibem a formação de estruturas irregulares em proteínas, evitando um dos fatores chave para o desenvolvimento da doença (PASTOR et al., 2010).

Além destas, existem muitas outras classes de metabólitos secundários importantes para o homem, como butirolactonas, terpenos, lantipeptídeos e híbridos de mais de uma classe.

Os actinomicetos tem a capacidade de sintetizar muitas destas classes de metabólitos secundários. Seus compostos apresentam diferentes atividades biológicas, incluindo antimicrobianos, antivirais, herbicidas, pesticidas, anti-parasitários, imunossupressores e muitos outros. Aproximadamente 80% dos antibióticos conhecidos comercialmente são provenientes de metabólitos secundários de actinomicetos, em especial, dos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora*.

Ademais, estes dois gêneros são amplamente descritos quanto a outras importantes características biotecnológicas, como a produção de enzimas extracelulares (BHAT et al., 2013). Muitas linhagens ainda produzem pigmentos como melaninas, que possuem propriedades antioxidantes e protetoras contra a radiação ultravioleta. Estes compostos são frequentemente usados na medicina, farmacologia e na preparação de cosméticos (QUADRI; DAYANAND AGSAR, 2012).

1.5 Gênero *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* pertence à Ordem Streptomycetales, Família Streptomycetaceae, dentro da Classe Actinobacteria. São bactérias Gram-positivas, aeróbias e filamentosas. Em termos de número e variedade de espécies identificadas, representa um dos maiores táxons que compõe o grupo dos actinomicetos. Linhagens deste gênero têm sido descritas em uma grande variedade de nichos, sendo algumas, inclusive, patógenos de animais e plantas (FLÄRDH; BUTTNER, 2009). No entanto, *Streptomyces* é principalmente difundido no solo, sendo o actinomiceto mais isolado neste ambiente (HASANI; KARIMINIK; ISSAZADEH, 2014). Em condições secas e alcalinas, *Streptomyces* pode chegar a compor 40% da população bacteriana do solo, e graças à sua morfologia filamentosa e ramificada, ajudam a manter o solo em consistência mais compacta, evitando que seja facilmente erodida (VETSIGIAN; JAJOO; KISHONY, 2011). São geralmente mesofílicos, apresentando crescimento ótimo em temperaturas entre 25 °C e 35 °C.

Possuem desenvolvimento micelar aéreo, no qual hifas aéreas se diferenciam em cadeias de esporos, facilitando sua propagação e tornando-os adaptados à dispersão no ambiente (VENTURA et al., 2007). Ao encontrar um ambiente favorável para seu desenvolvimento, o esporo germina dando origem à forma vegetativa da bactéria. Esta é composta por hifas que se ramificam e se projetam sob o substrato, formando estruturas denominadas micélio substrato. O crescimento das colônias de *Streptomyces* é vagaroso e os cultivos geralmente possuem cheiro de terra molhada, devido à produção de geosmina. As colônias, em um primeiro momento, apresentam superfície suave e lisa. Porém, na escassez de nutrientes, inicia-se o desenvolvimento dos micélios aéreos com esporos, e as colônias assumem uma aparência granular, aveludada ou pulverosa (FLÄRDH; BUTTNER, 2009).

O gênero *Streptomyces* é responsável pela produção de muitos dos antibióticos conhecidos pelo homem. Por serem bactérias primariamente de solo, acredita-se que produzam seu arsenal de antibióticos para eliminar a concorrência de outros microrganismos que disputam as mesmas fontes de nutrientes em seu habitat (LASKARIS et al., 2010). Devido ao grande número de moléculas bioativas que produzem, *Streptomyces* é o gênero de actinomicetos mais estudado. Atualmente, o número de compostos antimicrobianos provenientes apenas do gênero *Streptomyces* consiste em dois terços dos antibióticos naturais já descobertos (GAUTHAM et al., 2012). A busca por antibióticos produzidos por *Streptomyces* começou em 1942, com o descobrimento da estreptomicina produzida por *Streptomyces griseus*. A partir de então, os esforços se intensificaram na busca de novos antibióticos produzidos por este gênero. Nas duas décadas que se seguiram, a quantidade de novas moléculas descobertas aumentou quase exponencialmente, revelando diferentes possibilidades de aplicações. Entretanto, no final da década de 1990, foi observado um declínio acentuado de novas descobertas envolvendo o gênero *Streptomyces*. O custo das pesquisas havia aumentado, e apesar de novos compostos ainda serem descobertos, a maioria destes eram análogos de compostos já descritos. (WATVE et al., 2001). Havia a urgente necessidade do surgimento de novos fármacos, contra linhagens de bactérias multi-resistentes, vírus mortais como o HIV, fitopatógenos que afetavam a agricultura, entre outros problemas emergentes. Graças à renovação das metodologias clássicas para triagem de microrganismos e o desenvolvimento de tecnologias mais acessíveis para estudos genômicos e bioquímicos, o interesse neste campo de pesquisa aumentou novamente no início deste século (BÉRDY, 2005; HASANI; KARIMINIK; ISSAZADEH, 2014)

Além da produção de diversos compostos antibióticos, *Streptomyces* também se destaca entre os actinomicetos pela capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas com aplicação industrial. Como são bactérias quimiorganotróficas que vivem comumente no solo como saprófitas, utilizam estas enzimas na decomposição inicial de matéria orgânica de origem vegetal. Produzem uma complexa bateria de enzimas extracelulares que permite a hidrólise de polissacarídeos como celulose, xilana, pectina, lignina. Enzimas com estas propriedades são comumente usadas nas indústrias têxtil, alimentícia, de papel, na agricultura e na alimentação animal (CHATER et al., 2010). Algumas linhagens também já foram descritas como promotoras de crescimento vegetal, seja atuando como controle biológico a

fitopatógenos, seja na produção de fitormônios como a auxina ácido indol 3-acético (AIA), o que evidencia o potencial biotecnológico destas bactérias em outras áreas que não a de biofármacos (GOPALAKRISHNAN et al., 2013).

1.6 Gênero *Micromonospora*

O gênero *Micromonospora* pertence à Ordem Micromonosporales, Família Micromonosporaceae. Reúne actinomicetos Gram-positivos, aeróbios e filamentosos, porém possuem pouco ou nenhum desenvolvimento micelar aéreo, ao contrário do gênero *Streptomyces*. Possuem desenvolvimento micelar submerso no substrato, com hifas septadas, pequenas e finas. Como o seu nome sugere, este gênero produz esporos individuais, diretamente aderidos ao micélio substrato ou à pequenas hifas especializadas. Estas podem ser organizadas em cachos, ramos ou encontradas individualmente. Os esporos são hidrofílicos, sendo facilmente dispersos pela água (GENILLOUD, 2012; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Diversas linhagens produzem pigmentos carotenóides em seus micélios, o que resulta nas colorações características do gênero, que variam entre o amarelo, vermelho, laranja, marrom, roxo e preto (BOUMEHIRA et al., 2016).

Micromonospora são isoladas geralmente de solos de pH alcalino ou neutro e apresentam crescimento ótimo na faixa de temperatura entre 20 °C e 40 °C (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). São amplamente distribuídas em ambientes aquáticos como rios, lagos (DE MENEZES et al., 2008), sedimentos litorâneos (ZHAO et al., 2004) e ambientes marinhos (SUPONG et al., 2013; TANASUPAWAT; JONGRUNGRUANGCHOK; KUDO, 2010), onde predominam, em comparação com outros actinomicetos. São consideradas parte da microbiota endógena de lagos, onde desempenham importante papel na degradação de celulose e outros resíduos vegetais (DE MENEZES et al., 2008). Também participam da ciclagem de nutrientes no solo, hidrolisando polissacarídeos complexos como celulose, quitina e lignina. Produzem um amplo espectro de enzimas hidrolíticas que atuam na parede celular vegetal, tornando-as interessantes para a produção de biocombustíveis (HIRSCH; VALDÉS, 2010). Além de serem encontradas em ambientes terrestres e aquáticos, espécies de *Micromonospora* têm sido frequentemente descritas em associação com diversas espécies de esponjas marinhas (ABDELMOHSEN et al., 2010) e com raízes

de plantas, onde atuam como importantes promotoras de crescimento vegetal e biocontroles (CARRO et al., 2013; HIRSCH; VALDÉS, 2010).

São reconhecidas como importante fonte de metabólitos secundários com atividade farmacológica, sendo o segundo maior grupo de bactérias produtoras de compostos bioativos, perdendo lugar apenas para o gênero *Streptomyces* (BÉRDY, 2005). A gentamicina é o mais famoso antibiótico produzido pelo gênero *Micromonospora*. O sucesso deste antibiótico aminoglicosídeo reside em seu espectro de ação, que abrange tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. A gentamicina foi isolada pela primeira vez de uma linhagem de *Micromonospora purpurea*, em 1963, e após sua descoberta o gênero *Micromonospora* tornou-se uma importante fonte no desenvolvimento de novas drogas. Mais de 740 antibióticos já foram isolados de linhagens de *Micromonospora* até o momento (BOUMEHIRA et al., 2016) incluindo antibióticos com atividade antitumoral, como antraquinonas e antraciclinas (BÉRDY, 2005; IGARASHI et al., 2007).

Nos últimos anos, têm-se observado um drástico aumento de descrições de novas espécies de *Micromonospora* isoladas de diferentes ecossistemas, incluindo terrestres, marinhos e de água doce (DE MENEZES et al., 2008; GUROVIC et al., 2013; MOHAN et al., 2013). Estes actinomicetos que eram pouco estudados no passado, possuíam 14 espécies descritas até o ano 2000. Com o crescente interesse por este gênero, o número de espécies validadas em publicações científicas chegou à aproximadamente 70 no ano de 2016 (BOUMEHIRA et al., 2016).

1.7 Estudos genômicos e bioinformática

Após a década de 1970, quando houve o ápice das descobertas de metabólitos secundários em actinomicetos, foi observada a diminuição na descrição de novas moléculas bioativas. Especulou-se que a causa desta estagnação estaria relacionada à extensa exploração desses microrganismos durante muitas décadas, o que teria esgotado as possibilidades de novas descobertas. Porém, com o advento da tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) e sofisticadas ferramentas de bioinformática, tornou-se evidente que este declínio não estava relacionado ao esgotamento de compostos ou de novos microrganismos, senão à diminuição da intensidade nas pesquisas, seja por perda de interesse dos setores investidores, ou

pela falta de novas metodologias que possibilitassem o isolamento de novos microrganismos (NINGTHOUJA; SANASAM; NIMAICHAND, 2009).

Hoje o sequenciamento de ácidos nucleicos é parte integral da ciência moderna. Protocolos de sequenciamento são realizados rotineiramente em muitas áreas da microbiologia, sendo para o rastreamento de doenças infecciosas ou para o estudo da diversidade de comunidades microbianas (VINCENT et al., 2015).

O sequenciamento de nova geração com sua tecnologia de *high-throughput* (larga-escala), permitiu a geração de milhões de fragmentos de leitura, usualmente referidos como *reads*, em uma única máquina e um curto período de tempo. Desde então, muitas outras tecnologias de NGS surgiram, incluindo o sequenciamento pela plataforma Illumina, que desde 2006 tem ocupado grande parte no mercado NGS. O custo do sequenciamento tornou-se cada vez mais acessível, possibilitando a laboratórios do mundo todo conduzirem suas próprias pesquisas de sequenciamento (VINCENT et al., 2015).

Um grande número de genomas completos de actinomicetos foi sequenciado desde então, e a análise destes genomas possibilitou a identificação de novos isolados e novos compostos bioativos com potenciais industrial e terapêutico significativos (SENGUPTA et al., 2015).

Os genes responsáveis pela biossíntese de um metabólito secundário estão, quase sempre, adjacentes no genoma. Esta organização é denominada *cluster* de genes biossintéticos (DOROGHAZI; METCALF, 2013). Os *clusters* de genes envolvidos na síntese de produtos naturais têm características definidas, sendo possível prever suas funções através de ferramentas de bioinformática (ALONSO-VEGA et al., 2012). O *pipeline* antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) realiza a identificação *in silico* de *clusters* biossintéticos de diversas classes, entre elas policetídeos, peptídeos não ribossomais, terpenos, aminoglicosídeos, aminocumarinas, indolocarbazóis, lantibióticos, bacteriocinas, nucleosídeos, betalactâmicos, butirolactonas, sideróforos e melaninas. O *pipeline* alinha a região do genoma, identificada como *cluster*, com seu equivalente mais próximo, proveniente de um banco de dados de *clusters* já conhecidos (MEDEMA et al., 2011)

Muitos pesquisadores têm expressado otimismo em relação às estratégias de bioinformática para a busca de novas moléculas bioativas. O principal motivo seria o fato de *Streptomyces*, e outros gêneros de actinomicetos, raramente expressarem seu

inventário completo de moléculas, quando cultivados em laboratório (DOROGHAZI; METCALF, 2013). A espécie-modelo *Streptomyces coelicolor* A3(2), por exemplo, teve seu potencial explorado por 40 anos antes de ter seu genoma sequenciado, e era conhecida por produzir apenas 4 metabólitos secundários. O sequenciamento de seu genoma revelou 18 *clusters* de genes biossintéticos adicionais (CHALLIS, 2008). Portanto, ser capaz de classificar e comparar os genes de interesse biotecnológico catalogando sua diversidade, é um primeiro e importante passo para a exploração completa do potencial de uma bactéria (DOROGHAZI; METCALF, 2013).

Estudos genômicos têm contribuído fortemente para o entendimento da composição de *clusters* de genes que codificam moléculas bioativas. A determinação da função de cada um dos genes que compõe estes *clusters* possibilita a compreensão das rotas biossintéticas e a otimização da produção do metabólito secundário através de engenharia metabólica ou modificações nas condições de cultivo (BOUMEHIRA et al., 2016).

Contudo, devemos ter em mente que muitas vezes apenas análises *in silico* não são suficientes para se atingir um objetivo. Apesar de triagem de novas espécies de actinomicetos e sua identificação por meio de métodos que envolvem biologia molecular e análises de bioinformática serem estratégias promissoras (BOUMEHIRA et al., 2016), vale ressaltar que devem ser utilizadas em conjunto com estudos morfológicos e fisiológicos. A utilização de apenas uma das metodologias não mostra poder discriminatório suficiente para distinguir espécies muito próximas, sobretudo nos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora*. (BOUMEHIRA et al., 2016; RONG; HUANG, 2010).

1.8 Justificativa

Nas últimas décadas, tem-se observado a necessidade de orientar os estudos de prospecção para a exploração de novos habitats, buscando o isolamento de novas espécies e o descobrimento de novos compostos bioativos. Os rios são exemplos de ecossistemas que possuem alta diversidade de microrganismos e a presença de táxons como os actinomicetos, o que aumenta a probabilidade do isolamento de linhagens com grande potencial biotecnológico. Dessa forma, a Bacia do Rio Tietê, constitui um provável *hotspot* para o isolamento de novos microrganismos produtores de moléculas de aplicação biotecnológica, como antibióticos e enzimas hidrolíticas.

Análises *in silico*, com a utilização de ferramentas de bioinformática, aliadas a estudos *in vitro*, possibilitam a caracterização de novos isolados em nível morfológico, fisiológico e genômico, gerando um perfil mais completo destes microrganismos. Isto torna possível a máxima exploração do potencial biotecnológico destas linhagens.

5 CONCLUSÕES

- Três dos isolados de actinomicetos representam possíveis duas novas espécies de *Streptomyces* (NBS 10/01 e NBS 14/02) e uma de *Micromonospora* (NBS 11/28), com constatadas atividades antimicrobianas e produção de enzimas lignocelulolíticas.

- Os demais isolados pertencem às espécies *S. bingchenggensis* (NBS 14/10), *S. lavendulae* (NBA 43/10), *S. humi* (NBA 51/00) e *S. gancidicus* (NBA 55/19); *M. sediminicola* (NBS 11/29) e *M. tulbaghiaie* (NBA 65/00).

- Todos os isolados do presente estudo são interessantes biotecnologicamente, sendo pela produção de moléculas de atividade antibacteriana, antifúngica, lignocelulolítica ou pela produção de pigmentos solúveis e/ou melanina, que podem ser empregados em diversos setores industriais.

- Os isolados NBS 10/01, NBS 14/10, NBA 43/10 e NBA 55/19 produzem moléculas com potencial para serem utilizadas no desenvolvimento de drogas que atuam sobre linhagens multiresistentes, incluindo *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* MRSA.

- Todos os isolados produzem moléculas de atividade antifúngica que podem beneficiar setores agrícolas ao combater fungos fitopatogênicos.

- Todos os isolados do estudo produzem enzimas lignocelulolíticas, algumas identificadas como termoestáveis por ferramentas *in silico*. Estas enzimas constituem boas candidatas para ensaios adicionais visando sua utilização em setores industriais.

- As anotações funcionais evidenciaram o potencial dos isolados de produzirem diferentes classes de moléculas em relação as suas espécies mais próximas.

- As análises de anotação *in silico* complementaram as triagens de atividades biológicas, corroborando com resultados obtidos, mostrando possíveis *clusters* crípticos ou de moléculas de atividades biológicas que não foram triadas no presente estudo. Estes dado constituem valiosa fonte de informação para estudos futuros.

REFERÊNCIAS*

ABDELMOHSEN, U. R. et al. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 399–412, 2010.

ALONSO-VEGA, P. et al. Genome sequence of *Micromonospora lupini* Lupac 08, isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 15, p. 4135, 2012.

AMORE, A. et al. Cloning and recombinant expression of a cellulase from the cellulolytic strain *Streptomyces* sp. G12 isolated from compost. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 164, 2012.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719–739, 2005.

AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 75, 2008.

BALLAV, S. et al. Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 3, p. 323–330, 2015.

BENEDICT, R. G. et al. Further Studies in the Evaluation of Carbohydrate Utilization Tests as Aids in the Differentiation of Species of *Streptomyces*. **Applied microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1–6, 1955.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D30–D35, 2015.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BENTLEY, S. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, n. 6885, p. 141–147, 2002.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites: A personal view. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2005.

BHAT, S. A. et al. Secondary metabolites of actinomycetes as potential source of antibiotics. **Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 41–46, 2013.

BOUMEHIRA, A. Z. et al. Recent progress on the development of antibiotics from the genus *Micromonospora*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 2, p. 199–223, 2016.

BRUCE, T. et al. Bacterial community diversity in the brazilian atlantic forest soils. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 4, p. 840–849, 2010.

BUSARAKAM, K. et al. *Streptomyces leeuwenhoekii* sp. nov., the producer of chaxalactins and chaxamycins, forms a distinct branch in *Streptomyces* gene trees. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 5, p. 849–861, 2014.

CARRO, L. et al. Diversity of *Micromonospora* strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of *Pisum sativum* analyzed by multilocus sequence analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 73–80, 2012.

CARRO, L. et al. *Micromonospora* is a normal occupant of actinorhizal nodules. **Journal of Biosciences**, v. 38, n. 4, p. 685–693, 2013.

CHALLIS, G. L. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. **Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1555–1569, 2008.

CHATER, K. F. et al. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 171–198, 2010.

CHAUDHARY, H. S. et al. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 8 SUPPL, p. S83–S94, 2013.

DE MENEZES, A. B. et al. Cellulose degradation by micromonosporas recovered from freshwater lakes and classification of these actinomycetes by DNA gyrase B gene sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22, p. 7080–7084, 2008.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 41–55, 2008.

DOROGHAZI, J. R.; METCALF, W. W. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 611, 2013.

ENCHEVA-MALINOVA, M. et al. Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 4, p. 721–727, 2014.

EVEREST, G. J.; MEYERS, P. R. *Micromonospora equina* sp. nov., isolated from soil from a Racecourse. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART3, p. 879–885, 2013.

FLÄRDH, K.; BUTTNER, M. J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 36–49, 2009.

GAUTHAM, S. A. et al. Isolation , Characterisation and Antimicrobial Potential of *Streptomyces* Species from Western Ghats of Karnataka , India. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 5, n. 2, p. 233–238, 2012.

GENILLOUD, O. Genus I. *Micromonospora*. In: GOODFELLOW, M. et al. (Eds.). . **Bergey's manual of systematic bacteriology: The Actinobacteria**. 2nd editio ed.

Athens: Springer, 2012. p. 1039–1057.

GIBBONS, S. M. et al. Human and environmental impacts on river sediment microbial communities. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–9, 2014.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136–145, 2007.

GOPALAKRISHNAN, S. et al. Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 574, 2013.

GRAFFUNDER, E. M.; VENEZIA, R. A. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 999–1005, 2002.

GRIGOREVSKI DE LIMA, A. L. et al. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 272–277, 2005.

GRIGORIEV, I. V et al. The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. **Nucleic acids research**, v. 40, n. November 2011, p. 1–7, 2011.

GUO, Y. P. et al. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: Use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 149–159, 2008.

GUROVIC, M. S. V. et al. *Micromonospora schwarzwaldensis* sp. nov., a producer of telomycin, isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART10, p. 3812–3817, 2013.

HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied microbiology**, v. 22, n. 2, p. 205–209,

1971.

HAQUE, M. et al. Antibacterial Potential of Ethyl-Acetate Extracts of Marine *Streptomyces* spp. AIAH-10 against Drug Resistant *Escherichia coli*. **British Microbiology Research Journal**, v. 7, n. 3, p. 143–150, 2015.

HASANI, A.; KARIMINIK, A.; ISSAZADEH, K. Streptomycetes : Characteristics and Their Antimicrobial Activities. v. 2, n. 1, p. 63–75, 2014.

HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 26, p. 4688–4716, 2009.

HIRSCH, A. M.; VALDÉS, M. *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 536–542, 2010.

IGARASHI, Y. et al. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 13, p. 3702–3705, 2007.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

KÄMPFER, P. Genus I. *Streptomyces*. In: GOODFELLOW, M. et al. (Eds.). . **BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology**. second ed. Athens: Springer, 2012. p. 1455–1767.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503–507, 2008.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n.

12, p. 1647–1649, 2012.

KIM, B.; AL-TAI, A. M.; KIM, S. B. *Streptomyces thermocoprophilus* sp . nov ., a streptomycete. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 505–509, 2000.

KIM, S. B. et al. Two Moderately Thermophilic Carboxydrotrophic Species From Soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 1 998, p. 59–68, 1998.

KLAUSEN, C. et al. Occurrence of odour-producing actinomycetes and other bacteria in the North Pine River Dam , Brisbane , Australia. **Griffith Research Online**, p. 19, 2004.

LASKARIS, P. et al. Coevolution of antibiotic production and counter-resistance in soil bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 783–796, 2010.

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Biology of actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, v. 21, n. November, p. 71–100, 1967.

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

LOCCI, R. Streptomycetes and related genera. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Eds.). . **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. p. 2451—93.

LUO, R. et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. **GigaScience**, v. 1, n. 1, p. 18, 2012.

MALIK, K.; TOKKAS, J.; GOYAL, S. Microbial Pigments: A review. **International Journal of Microbial Resource Technology Accepted**, v. 41, n. 4, p. 361–365, 2012.

MCCARTHY, A. J. Lignocellulose-degrading actinomycetes. **FEMS Microbiology**

Letters, v. 46, n. 2, p. 145–163, 1987.

MEDEMA, M. H. et al. AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 2, p. 339–346, 2011.

MELBY, J. O.; NARD, N. J.; MITCHELL, D. A. Thiazole/oxazole-modified microcins: Complex natural products from ribosomal templates. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 3, p. 369–378, 2011.

MEYERS, P. R. et al. *Streptomyces speibonae* sp. nov., a novel streptomycete with blue substrate mycelium isolated from South African soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 801–805, 2003.

MIDAGLIA, C. L. V. **Proposta de Implantação do índice de abrangência espacial de monitoramento - IAEM por meio da evolução da rede de qualidade das águas superficiais do Estado de São Paulo**. São Paulo: Tese de Doutorado em Geografia, 2011.

MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P. A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1432–1441, 2008.

MINNIKIN, D. E. et al. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. **Journal of Microbiological Methods**, v. 2, n. 5, p. 233–241, 1984.

MOHAN, Y. S. Y. V. J. et al. Selective screening , isolation and characterization of antimicrobial agents from marine actinomycetes. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 443–449, 2013.

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

MORTATTI, J. et al. Distribution of heavy metals in the geochemical phases of

sediments from the Tietê River, Brazil. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 25, n. 3, p. 194–200, 2013.

MUTHU, M. R. et al. Isolation and Identification of Actinomycetes *Isoptericola variabilis* From Cauvery River Soil Sample. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 2, n. 6, p. 236–245, 2013.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–8, 2000.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1999.

NETO, A. B. et al. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, FED-batch and continuous processes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 4, p. 557–563, 2005.

NINGTHOUJA, D. S.; SANASAM, S.; NIMAICHAND, S. Screening of Actinomycete Isolates from Niche Habitats in Manipur for Antibiotic Activity. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 221–225, 2009.

NINGTHOUJAM, D. S.; SANASAM, S.; NIMAICHAND, S. Studies on Bioactive Actinomycetes in a Niche Biotope , Nambul River in Manipur , India. **Microbial & Biochemical Technology**, p. 1–6, 2011.

NOURANI, E.; KHUNJUSH, F.; DURMUÄY, S. Computational approaches for prediction of pathogen-host protein-protein interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. February, p. 1–10, 2015.

OREN, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline systems**, v. 4, p. 2, 2008.

PASTOR, J. M. et al. Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological

production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 782–801, 2010.

PAUL, M.; VAN DER DONK, W. A. Chemical and Enzymatic Synthesis of Lanthionines. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 36, n. 47, p. 23–37, 2005.

PEDROLLI, D. B. et al. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 9–18, 2009.

PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1659–1670, 2010.

PRASAD, P.; SINGH, T.; BEDI, S. Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. **Journal of King Saud University - Science**, v. 25, n. 3, p. 245–250, 2013.

PRIDHAM, T. G. et al. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiotics Annual**, p. 947–953., 1957.

PRUETT, T. L. Universal Screening for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at Hospital Admission and Nosocomial Infection in Surgical Patients. **Yearbook of Surgery**, v. 2009, n. 10, p. 144–145, 2009.

QUADRI, S. R.; DAYANAND AGSAR. Detection of melanin producing thermo-alkaliphilic *Streptomyces* from limestone quarries of the Deccan traps. **World Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 8–12, 2012.

RAMSEY, P. W. et al. Relationship between communities and processes; new insights from a field study of a contaminated ecosystem. **Ecology Letters**, v. 8, n. 11, p. 1201–1210, 2005.

REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and

subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 1–7, 1985.

RIFAAT, H. M. The biodiversity of Actinomycetes in the River Nile exhibiting antifungal activity. **Journal of Mediterranean Ecology**, v. 4, n. 3, p. 5–7, 2003.

RIZVI, R.; KAMBLE, L.; KADAM, A. Searching the submerged: A report on prevalence of actinomycetes in sediments of river Godavari and optimized strategy for their isolation. **Trends in Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 16–19, 2012.

RONG, X.; GUO, Y.; HUANG, Y. Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus subsp. solvifaciens*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 314–322, 2009.

RONG, X.; HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA - DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 696–703, 2010.

RUBIANO-LABRADOR, C. et al. Proteogenomic insights into salt tolerance by a halotolerant alpha-proteobacterium isolated from an Andean saline spring. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 36–47, 2014.

SAADOUN, I.; GHARAIBEH, R. The *Streptomyces* flora of Jordan and its' potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 465–470, 2002.

SAHA, R. et al. Microbial siderophores: A mini review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303–317, 2013.

SANDLE, T. An approach for the reporting of microbiological results from water systems. **PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA**, v. 58, n. 4, p. 231–237, 2004.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.

SÃO PAULO (ESTADO). Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo - 2013**. São Paulo, 2014. 434 p.

SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos, Coordenadoria de Recursos Hídricos. **Situação dos Recursos Hídricos no Estado de São Paulo: 2007**. São Paulo, 2009. 146 p.

SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos, Coordenadoria de Recursos Hídricos. **Relatório de situação dos recursos hídricos no Estado de São Paulo - Ano base 2009**. São Paulo, 2011. 208 p.

SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos, Coordenadoria de Recursos Hídricos. **Situação dos recursos hídricos no Estado de São Paulo : 2015 / Governo do Estado de São Paulo**. São Paulo, 2017. 368 p.

SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria do Meio Ambiente. **Relatório de qualidade ambiental 2015**. São Paulo, 2015. 275 p.

SASSER, M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. **Technical Note**, v. 101, n. February, p. 1–6, 2001.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SEEMANN, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SENGUPTA, S. et al. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from

unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 170, 2015.

SHARMA, H.; PARIHAR, L. Antifungal activity of extracts obtained from actinomycetes. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1, n. 10, p. 197–200, 2010.

SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 285–295, 2003.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313–340, 1966.

SILVA, M. S. **Identificação de actino bactérias em solos de cerrado mineiro durante baixa pluviosidade**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVA, U. B. E. **Análise metagenômica da microbiota de ambientes aquáticos do estado do Rio Grande do Norte - Brasil**. 2013. 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

SINGH, L. S.; SHARMA, H.; TALUKDAR, N. C. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2014.

STALEY, C. et al. Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 5, p. 1147–1158, 2013.

STANECK, J. L.; ROBERTS, G. D. Simplified Approach to Identification of Aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography. **Applied Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 226–231, 1974.

SUPONG, K. et al. *Micromonospora sediminicola* sp. nov., isolated from marine

sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART2, p. 570–575, 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TANASUPAWAT, S.; JONGRUNGRUANGCHOK, S.; KUDO, T. *Micromonospora marina* sp. nov., isolated from sea sand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 648–652, 2010.

TERKINA, I.; PARFENOVA, V.; AHN, T. Antagonistic Activity of Actinomycetes of Lake Baikal. **Applied Biochemistry & Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 173, 2006.

THAKUR, D. et al. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 17, n. 4, p. 242–249, 2007.

THAWAI, C. et al. *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 51, n. 4, p. 229–234, 2005.

TRUJILLO, M. E. et al. *Micromonospora mirobrigensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 877–880, 2005.

TRUJILLO, M. E. et al. *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2799–2804, 2007.

UCHIDA, K. et al. A new rapid method of glycolate test by diethyl ether extraction , which is applicable to a small amount of bacterial cells of less than one milligram. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 56, p. 49–56, 1999.

UJIKAWA, K. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. **Revista Brasileira de Ciências**

Farmacêuticas, v. 39, n. 2, p. 149–158, 2003.

VENTURA, M. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.

VETSIGIAN, K.; JAJOO, R.; KISHONY, R. Structure and evolution of *Streptomyces* interaction networks in soil and in silico. **PLoS Biology**, v. 9, n. 10, 2011.

VINCENT, A. T. et al. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. **Journal of Microbiological Methods**, v.138, p.60-71, 2015.

WATVE, M. G. et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**, v. 176, n. 5, p. 386–390, 2001.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WELLINGTON, E. M. H. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–165, 2013.

ZHAO, H. et al. Differentiation of *Micromonospora* Isolates from a Coastal Sediment in Wales on the Basis of Fourier Transform Infrared Spectroscopy , 16S rRNA Sequence Analysis , and the Amplified Fragment Length Polymorphism Technique Differentiation of *Micromonospora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6619–6627, 2004.