

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA**

LARISSA DE CASSIA BARBOSA

Bioprospecção da atividade antimicrobiana do caldo de fermentação produzido pelo endofítico *Paenibacillus terraе* isolado de *Tabebuia* spp. do Cerrado em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*.

SÃO CARLOS

2023

LARISSA DE CASSIA BARBOSA

Bioprospecção da atividade antimicrobiana do caldo de fermentação produzido pelo endofítico *Paenibacillus terrae* isolado de *Tabebuia* spp. do Cerrado em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Paiva de Sousa

São Carlos

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nunca me deixou desistir e sempre me deu forças para continuar, e toda energia do universo;

Aos meus pais Silvana e Barbosa, por aguentarem todas as minhas lamentações, e estarem sempre lá para me apoiar todas as vezes em que achei que não iria conseguir;

Ao meu irmão Lucas, por ser minha fonte de inspiração em querer sempre ser melhor, e ser o meu exemplo;

Aos meus amigos Nathalia, Vinicius, Karina e Marisa, por me acompanharem durante a jornada da graduação e por todos os momentos que compartilhamos, entre muitas risadas e surtos;

À profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, por me receber em seu laboratório e por todo o apoio e orientação durante essa jornada;

Ao técnico Dr. Paulo Andrade, por estar sempre disposto a ajudar e ensinar todos os procedimentos do laboratório, e pelo apoio nos momentos cruciais;

Às amigas que fiz no LaMiB, por tornar o dia a dia do laboratório mais alegre;

À todos que fazem parte da minha vida direta ou indiretamente e que contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho;

RESUMO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, e classificado como “hot spot” por possuir diversas espécies endêmicas e pela grande ameaça de perda territorial, porém sua biodiversidade ainda é pouco conhecida. Nessa biodiversidade se encontram microrganismos endofíticos, que estão em foco na obtenção e produção de metabólitos secundários bioativos, pelo potencial biotecnológico identificado nos mesmos. O presente estudo buscou avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico de *Paenibacillus terrae*, endofítico isolado de *Tabebuia* spp., e também sua atividade em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*, buscando uma maior bioatividade. Para os microrganismos testados, detectou-se halos de inibição (mm) de 8,6, 9,4 e 11,4 para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, respectivamente. Contra *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*, não detectou-se inibição devido, provavelmente, à inibição seletiva. *Paenibacillus terrae* apresentou resultados melhores quando em co-cultivo com *Bacillus megaterium*, contra *E. coli* e *S. aureus*, com halos de 10,6 e 9,5 mm, respectivamente. Em contrapartida, o co-cultivo com *B. megaterium*, contra *C. albicans*, não houve inibição. O mesmo aconteceu com os testes de co-cultivo de *P. terrae* com *B. thuringiensis*, contra todos os microrganismos testados. Esses resultados obtidos devem sinalizar para uma maior pressão seletiva entre os microrganismos testados, gerando a presença de halos de inibição. Foi testada a ação da *Paenibacillus terrae* com relação a antibióticos selecionados, amicacina, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefepime, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, nitrofurantoína, oxacilina, sulfazotrim, teicoplanina e tetraciclina, os maiores potenciais inibitórios foram contra sulfazotrim, cloranfenicol e amicacina, com 37,3, 31,0 e 22,25 mm de inibição. Carbenicilina, cefalotina, clindamicina e oxacilina não inibiram. Os dados obtidos são similares a outros trabalhos e indicam ainda a permanência de susceptibilidade microbiana à maioria dos antibióticos testados. A bioprospecção de endofíticos é essencial para a busca por metabólitos bioativos visto que a produção de biomoléculas podem contribuir como agentes de biocontrole, inibição microbiana e parasitária, como anti-inflamatórios e na indústria, farmácia, medicina e biotecnologia.

Palavras-chave – Cerrado, Endofíticos, Atividade antimicrobiana, Co-cultivo

ABSTRACT

As the second largest Brazilian biome, the Cerrado is classified as a “hot spot” for its several endemic species and the great threat of territorial loss, but its biodiversity is still little known. In this biodiversity there are endophytic microorganisms, which are in focus for acquisition and production of secondary metabolites, due to the biotechnological potential identified in them. The present study sought to evaluate the antibacterial and antifungal potential of *Paenibacillus terrae*, an endophyte isolated from *Tabebuia* spp., and also its activity in co-culture with *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus megaterium*, seeking greater bioactivity. For the microorganisms tested, inhibition halos (mm) of 8.6, 9.4 and 11.4 were detected for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, respectively. Against *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus megaterium*, no inhibition was detected, probably due to selective inhibition. *Paenibacillus terrae* showed better results when co-cultivated with *Bacillus megaterium*, against *E. coli* and *S. aureus*, with halos of 10.6 and 9.5 mm, respectively. On the other hand, the co-culture with *B. megaterium*, against *C. albicans*, there was no inhibition. The same happened with the tests of co-culture of *P. terrae* with *B. thuringiensis*, against all tested microorganisms. These results should indicate a greater selective pressure among the microorganisms tested, generating the presence of inhibition halos. The action of *Paenibacillus terrae* was tested in relation to selected antibiotics, amikacin, ampicillin, carbenicillin, cephalothin, cefepime, clindamycin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, nitrofurantoin, oxacillin, sulfazotrim, teicoplanin, and tetracycline the greatest inhibitory potentials were against sulfazotrim, chloramphenicol and amikacin, with 37.3, 31.0 and 22.25 mm of inhibition. Carbenicillin, cephalothin, clindamycin and oxacillin did not inhibit. The data obtained are similar to other works and also indicate the permanence of microbial susceptibility to most of the tested antibiotics. The bioprospecting of endophytes is essential for the search for bioactive metabolites since the production of biomolecules can contribute as biocontrol agents, microbial and parasitic inhibition, as anti-inflammatories and in industry, pharmacy, medicine and biotechnology.

Keywords – Cerrado, Endophytes, Antimicrobial activity, Co-cultivation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Inibição de <i>Escherichia coli</i> pelo microrganismo <i>Paenibacillus terrae</i>	23
Figura 2: Inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> pelo microrganismo <i>Paenibacillus terrae</i>	23
Figura 3: Inibição de <i>Candida albicans</i> pelo microrganismo <i>Paenibacillus terrae</i>	24
Figura 4: Inibição do crescimento de <i>E.coli</i> pelo co-cultivo de <i>Paenibacillus terrae</i> e <i>Bacillus megaterium</i>	26
Figura 5: Inibição do crescimento de <i>S.aureus</i> pelo co-cultivo de <i>Paenibacillus terrae</i> e <i>Bacillus megaterium</i>	26
Figura 6: Inibição do crescimento de <i>Paenibacillus terrae</i> pelos antibióticos Amicacina (AK), Carbenicilina (CA), Cefepime (CM), Gentamicina (GE), Nitrofurantoina (NT) e Teicoplanina (TE).....	28
Figura 7: Inibição do crescimento de <i>Paenibacillus terrae</i> pelos antibióticos Ampicilina (AMP), Oxacilina (OX), Tetraciclina (TT) e Eritromicina (EI).....	28
Figura 8: Inibição do crescimento de <i>Paenibacillus terrae</i> pelos antibióticos Cefalotina (CFL), Clindamicina(CI), Cloranfenicol (CLO) e Sulfazotrim (SUT).....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média dos halos de inibição (DHalo-inibição mm) por <i>Paenibacillus terrae</i> contra microrganismos teste.....	22
Tabela 2: Média dos halos de inibição (DHalo-inibição mm) por <i>Paenibacillus terrae</i> em co-cultivo com <i>Bacillus megaterium</i> contra microrganismos teste.....	25
Tabela 3: Média dos halos de inibição (DHalo-inibição mm) por antibióticos, contra <i>Paenibacillus terrae</i>	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Cerrado.....	10
2.2 Espécies vegetais do Cerrado.....	10
2.3 <i>Tabebuia</i> spp.....	11
2.4 Microorganismos Endofíticos.....	12
2.4.1 <i>Paenibacillus terrae</i>	13
2.5 Atividade antimicrobiana.....	13
2.6 Testes de difusão em ágar.....	15
2.7 Co-cultivo na descoberta de novos compostos bioativos.....	16
2.7.1 Microorganismos utilizados no co-cultivo.....	16
2.7.1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Bacillus megaterium</i>	16
3. OBJETIVOS.....	18
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Preparo dos inóculos bacterianos.....	19
4.1.1 Padronização.....	19
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por poço	19
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana em co-cultivo pela metodologia de difusão em ágar por poço.....	20
4.4 Perfil de resistência a agentes antibacterianos pela metodologia de difusão em ágar por disco.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por poço	

21

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em co-cultivo pela metodologia de difusão em ágar por poço.....	23
5.3 Perfil de resistência a agentes antibacterianos pela metodologia de difusão em ágar em disco.....	25
6.DISSCUSSÃO.....	28
7.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
8.PERSPECTIVAS FUTURAS.....	30
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é considerado a savana tropical mais diversificada do mundo, e possui 44% da flora endêmica, juntamente com uma grande diversidade de habitats e espécies (RATTE, J.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J.F., 2003).

Inseridos nessa biodiversidade temos plantas capazes de produzir diferentes metabólitos secundários bioativos, porém, geralmente é necessária uma grande quantidade de material botânico para obter pequenas quantidades da substância alvo, podendo tornar escassas as plantas medicinais que produzem tais substâncias. Dessa forma, o entendimento das interações entre os microrganismos endofíticos e suas plantas hospedeiras se torna tão importante, visto que muitos deles são capazes de produzir diversos compostos, incluindo aqueles produzidos por sua planta hospedeira (GÓMEZ; LUIZ, 2018).

Entre as possíveis aplicações dos metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos destacamos a utilização como antibióticos, inseticidas, antioxidantes naturais, agentes antitumorais, além de muitas vezes trazerem benefícios para a planta hospedeira como promotores de crescimento vegetal e aumento da resistência da planta a estresses bióticos e abióticos (STELMASIEWICZ et al., 2023).

Estudos relataram comunidades microbianas endofíticas advindas de espécies do gênero *Tabebuia*, em que foi observada a biossíntese de compostos bioativos de interesse farmacológico, atuando também no desempenho da planta (BECERRA-LUCIO et al., 2021). Entre os endofíticos encontrados estava a bactéria *Paenibacillus terrae*, relatada como produtora de xilanase, catalase e CMCase, além de possuir atividade como possível agente de biocontrole demonstrando atividade contra diversos fitopatógenos, e também pela produção de compostos bioativos contra os microrganismos patogênicos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (SHIN et al., 2012; YU et al., 2019; LIANG et al., 2014; ROMANO, 2014).

Mostrando assim a microdiversidade presente em espécies de *Tabebuia*, e a importância da bioprospecção de microrganismos endofíticos por sua produção de compostos bioativos, com aplicações em diferentes indústrias, entre elas farmacológica, cosmética, agrária, entre outras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerrado

Sendo o segundo maior bioma brasileiro, o Cerrado, localizado na região central do Brasil, onde estão reunidos um conjunto de ecossistemas, contando com savanas, matas, campos e matas de galeria. Três formações vegetais podem ser encontradas nesse bioma, florestais, que formam dosséis podendo ser contínuos ou descontínuos, onde são predominantes espécies arbóreas (cerradão e mata seca); campestre, em que há o predomínio de espécies herbáceas com algumas espécies arbustivas, porém sem árvores na paisagem (campo sujo, campo-cerrado e campo limpo); e savânicas, onde estão presentes áreas com espécies arbustivas e árvores na paisagem sobre um estrato gramíneo, entretanto sem a formação de dosséis (cerrado sentido restrito e cerrado ralo) (SANO, 2007; MACHADO et al., 2008).

O Cerrado possui uma grande extensão e é classificado como um “hot spot” por possuir diversas espécies endêmicas e pela grande ameaça de perda territorial, porém sua biodiversidade ainda é pouco conhecida. Presentes nessa biodiversidade, podemos encontrar diversas paisagens com diferentes fisionomias de vegetação, entre elas a florística, compreendendo aproximadamente 6.429 espécies já catalogadas o que torna a flora do Cerrado a mais rica entre as savanas (SCARIOT; FELFILI; SILVA, 2005).

Machado (2016), aponta que entre 20% e 50% da porcentagem de espécies brasileiras podem estar contidas no Cerrado, variando com o grupo taxonômico, e que o endemismo pode ultrapassar os 70% em grupos como as plantas herbáceas.

2.2 Espécies vegetais do Cerrado

A vegetação rasteira característica do Cerrado apresenta gramíneas, arbustos, árvores baixas com troncos retorcidos e folhas rígidas (FERREIRA et al., 2022). Contendo plantas vasculares em grande número, somando mais de 7.000 espécies, entre elas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós (KLINK; MACHADO, 2005). Entre as espécies de árvores comuns do Cerrado estão *Anacardium*, *Anadenanthera*, *Andira*, *Aspidosperma*, *Byrsonima*, *Caryocar*, *Cassia*, *Copaifera*, *Dalbergia*, *Diospyros*, *Eugenia*, *Eriotheca*, *Hymenaea*, *Mauritia*, *Myracrodruon*, *Myrcia*, *Pseudobombax*, *Pterodon*, *Styrax*, *Sweetia*, em especial *Tabebuia* (às vezes as espécies do cerrado são tratadas como *Tecoma*), *Vochysia*, entre outras (EITEN, 1972).

2.3 *Tabebuia* spp.

O gênero *Tabebuia* é o maior dentro da família Bignoniaceae, e está entre os mais importantes devido às suas propriedades medicinais, anteriormente pertencia ao gênero *Tecoma*, e também já foi considerado sinônimo do gênero *Handroanthus*, contudo estudos recentes confirmaram que *Tabebuia* é polifilético, e que os dois gêneros estão aninhados em clados segregados, apesar disso sua taxonomia é complexa, exigindo mais parâmetros para classificação (GÓMEZ; LUIZ, 2018, INÁCIO; DIANESE, 2006).

Conhecidas popularmente como “ipês”, as árvores do gênero *Tabebuia* são importantes componentes da vegetação nativa do Cerrado, da floresta amazônica e da mata atlântica. Além de serem comumente encontrados em áreas urbanas, paisagens e jardins devido à sua floração colorida durante a estação seca, muitas de suas espécies são utilizadas pela indústria madeireira, por produzir madeira de alta qualidade para ferramentas agrícolas e construções de barcos, casas, móveis, entre outros usos. Na medicina tradicional em comunidades rurais, para tratar febre, dor, picadas de cobra, como vermífugo, antimicrobiano, anticoagulante, para anemia, congestão nasal, conjuntivite, feridas, gripes, problemas estomacais e cardíacos, inflamações cutâneas, renais e de garganta, também para câncer e tumores, sendo também comercializadas como material seco para infusões, comprimidos e xaropes (GÓMEZ; LUIZ, 2018, INÁCIO; DIANESE, 2006).

Uma grande variedade de composto bioativos foram encontrados distribuídos em diferentes partes dessas plantas, como por exemplo, estudos mostraram que o extrato de *T. rosea* ou a quercetina podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da obesidade (BARRIOS-NOLASCO et al., 2023). Partindo para o nível holobionte, estudos revelaram comunidades microbianas endofíticas em algumas espécies do gênero *Tabebuia*, envolvidas na biossíntese de compostos bioativos de interesse farmacológico, e outras funções ecológicas, como também no desempenho da planta (BECERRA-LUCIO et al., 2021).

ROMANO (2014), isolou microrganismos a partir das folhas de quatro espécies de *Tabebuia* spp., *Tabebuia aurea*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tabebuia heptaphylla* e *Tabebuia róseo-alba*, entre eles encontrou 18 bactérias, entre elas 15 pertencentes ao gênero *Bacillus* spp., 2 de *Paenibacillus* spp. e uma do gênero *Pantoea* spp., demonstrando a microdiversidade presente em quatro espécies de *Tabebuia*.

2.4 Microrganismos Endofíticos

Os microrganismos endofíticos vivem em vários tecidos e órgãos de plantas saudáveis, mantendo uma associação com seus hospedeiros durante pelo menos uma parte de seu ciclo de vida, sem fazer com que a planta hospedeira apresente sintomas óbvios de infecção, podem ser isolados do interior de uma planta ou da superfície do tecido vegetal desinfetado (HALLMANN, 1997; AZEVEDO et al., 2018; AFZAL et al., 2019; DING, 2018).

As bactérias endofíticas, podem ter uma vantagem com relação às bactérias que habitam a rizosfera, por viver dentro dos tecidos de uma planta, a oportunidade de exercer um efeito benéfico de forma direta é facilitado por estar sempre em contato com as células da planta. Os endofíticos, podem ser considerados um subconjunto da população bacteriana da rizosfera e/ou associada à raiz, visto que as bactérias que residem na rizosfera podem ter o potencial de entrar e colonizar as raízes das plantas, microecossistema amplamente conhecido como uma das fontes primárias de colonização endofítica. Pela rizosfera ser um ambiente amplamente competitivo para microrganismos ocuparem seu espaço e obterem nutrientes, há uma grande competição para estes organismos colonizarem os tecidos vegetais e obterem nutrientes. Dessa forma se proliferam nesse microambiente ocasionando em um possível efeito no crescimento e desenvolvimento da planta (SANTOYO et al., 2016).

Os endofíticos se mostraram um importante objeto de estudo para a obtenção e produção de produtos naturais, pelo potencial biotecnológico identificado nos mesmos, que permitiu a substituição na produção dessas substâncias diretamente dos tecidos vegetais, visto que diversas plantas ameaçadas de extinção foram relatadas por uma exploração indiscriminada pela busca de remédios (GÓMEZ; LUIZ, 2018).

Além das vantagens para a conservação do meio ambiente, e biossíntese de produtos naturais de importância na medicina, esses microrganismos também são capazes de proporcionar benefícios para a planta hospedeira, entre eles promoção de crescimento vegetal, com a produção de metabólitos secundários, podendo aumentar a resistência da planta a estresses bióticos e abióticos. Os metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos de plantas podem ter diversas aplicações como antibióticos, inseticidas, antioxidantes naturais, agentes antitumorais, etc. (STELMASIEWICZ et al., 2023).

Estudos concluíram que, em um compilado em escala global entre 5.600.000 espécies, em que se encontram animais, plantas e microrganismos, a terra abriga mais de 1 trilhão de espécies de microrganismos, porém somente uma pequena porcentagem desses organismos já

foi descoberta, representando grande potencial biotecnológico ainda desconhecido (LOCEY; LENNON, 2016).

2.4.1 *Paenibacillus terrae*

Considerada uma bactéria Gram-positiva, *Paenibacillus terrae* é anaeróbia facultativa, formadora de endosporos. Também relatada como produtora de xilanase e catalase, geralmente presente no solo se apresentando como colônias cor de creme e formato irregular, finas e translúcidas (YOON et al, 2003; SHIN et al., 2012).

Diversos estudos relataram o potencial da *Paenibacillus terrae* como possível agente de biocontrole e também suas características de promoção do crescimento vegetal. Entre eles estão relatos de atividade contra brusone no arroz causada por *M. oryzae* (YU et al., 2019), contra podridão cinzenta causada por *Botrytis cinerea* em *Solanum lycopersicum* e em *P. polyphylla* (KIM et al., 2017; TANG et al., 2022), contra *Campylobacter jejuni* pela produção de tridecaptina A (VAN BELKUM; LOHANS; VEDERAS, 2015), contra Podridão-de-Fusarium e Podridão radicular do tomateiro (SATO et al., 2014), também consta como inibidora de muitos outros patógenos de plantas, incluindo *R. solani*, *E. turcicum* e *X. campestris* pv. *Glycines* (YU et al., 2019).

Também foi constatada a produção de CMCase por *P.terrae*, com atividade de 2,08 U/mL sob condições de cultivo otimizadas, apresentando um rendimento maior do que a maioria das cepas de bactérias aeróbias, mas menor do que várias cepas de bactérias anaeróbias. Maior também que as cepas de fungos anaeróbicos, e menor que a maioria das cepas de fungos aeróbicos (LIANG et al., 2014).

Demonstrando sua capacidade de promoção de crescimento vegetal, *Paenibacillus terrae*, proporcionou um crescimento do arroz, aumentando o número e o comprimento das raízes em 34,2% e 34,1%, respectivamente, e também aumentou a resistência ao estresse regulando a expressão gênica (LIU et al., 2023).

Também foram observados a produção de compostos bioativos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, além de atividade citotóxica contra células tumorais e atividade anti-Leishmania, mostrando o grande potencial dessa bactéria (ROMANO, 2014).

2.5 Atividade antimicrobiana

Com o contínuo aparecimento de novos mecanismos bacterianos de resistência a antimicrobianos, as indústrias farmacêuticas se encontram em uma corrida para a produção de novos compostos, o que indica a importância e urgência da pesquisa de novos agentes antimicrobianos, visto que impacta diretamente nas opções de tratamento e controle de infecções, podendo aumentar a mortalidade, além de gerar questões econômicas, sendo um ponto crucial em setores do campo farmacêutico e cosmético (SEJAS et al., 2003; OSTROSKY et al., 2008).

O estudo dos agentes antimicrobianos pode ser considerado o primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, um estudo de grande importância em um país com tamanha biodiversidade, como o Brasil, que pode contribuir de forma significativa no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas a serem usadas na corrida contra a resistência a antimicrobianos (OSTROSKY et al., 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) liberou uma lista de agentes patogênicos para os quais são necessários novos antibióticos de forma urgente, entre eles estão a *E.coli*, classificada como prioridade crítica, e *S. aureus*, resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistência à vancomicina, classificado como prioridade alta (WHO, 2017). Em adição, a levedura *C.albicans* tem tido um aumento de resistência aos fungicidas atuais nos últimos anos, tornando tais microrganismos importantes objetos de estudo (SANGLARD, 2016).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa normalmente encontrada no trato gastrointestinal de animais homeotérmicos, representa aproximadamente 80% da microbiota aeróbia, entretanto para indivíduos vulneráveis, pode se tornar patogênica, sendo responsável por infecções urinárias e nosocomiais. Na década de 90 a resistência de *E.coli* à amoxicilina e à ampicilina atingiu cerca de 40% pelo uso indiscriminado ou a falta de acompanhamento no uso de antibióticos (ALVES et al., 2017; KORB et al., 2013; KARLOWSKY et al., 2002; PALOU et al., 2011; LINDGREN, KARLSSON, HUGHES, 2003).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, possuindo uma cápsula polissacarídica que reveste externamente sua parede celular, faz parte da microbiota humana, sendo encontrada principalmente na pele e mucosas, porém também é a principal causadora de bacteremia e endocardite infecciosa em indivíduos imunossuprimidos (WERTHEIM et al., 2005; TONG, et al., 2015). Até o surgimento de cepas resistentes na década de 50, infecções

causadas por *S.aureus* eram tratadas com penicilina, posteriormente foi desenvolvida a meticilina, entretanto, já na década de 60 surgiram relatos de cepas resistentes a meticilina, até então restritas ao ambiente hospitalar, e em 1990 uma nova linhagem resistente a meticilina associado à comunidade foi reportada em indivíduos sem fatores de risco, levando ao uso de vancomicina para o tratamento. (HAUSER, 2009; BOYCE, 2008; WONG, et al., 2017).

Candida albicans é um fungo leveduriforme, um organismo eucarioto e diplóide, também compõe a microbiota humana, podendo ser encontrada no trato gastrointestinal, na mucosa do trato respiratório e na pele, porém em indivíduos imunocomprometidos, pode promover infecção, sendo o quarto tipo de infecção hospitalar mais comum, levando a óbito em 42% dos casos (VIEIRA, SANTOS, 2017; GUDLAUGSSON et al., 2003; PAPPAS et al., 2003).

Frente ao cenário do aumento da resistência a antimicrobianos, os microrganismos endofíticos se mostram como um recurso promissor, para a bioprospecção de novos antimicrobianos, por serem uma ótima fonte de metabólitos secundários e compostos biológicos (STROBEL, DAISY, 2003; DAS, PATRA, BAEK 2016).

2.6 Testes de difusão em ágar

Existem diferentes métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana em diferentes situações, entre os mais utilizados está o teste de difusão em ágar, um método físico, em que o microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em um meio de cultura sólido e o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado é relacionado com a concentração da substância ensaiada (OSTROSKY et al., 2008).

O método de disco-difusão é um dos métodos mais utilizados em laboratórios de microbiologia no Brasil, é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (OSTROSKY et al., 2008; SEJAS et al., 2003). Este método se baseia na difusão, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro, pelo ágar, levando à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano (SEJAS et al., 2003).

No método de perfuração em ágar, o meio de cultura sólido é removido com o auxílio de cilindros de 9 mm de diâmetro para a formação de poços, em que é feita a aplicação das substâncias a serem analisadas, que se difundem pelo agár também levando à formação de

halos de inibição caso haja atividade antimicrobiana da substância sendo testada (OSTROSKY et al., 2008).

2.7 Co-cultivo na descoberta de novos compostos bioativos

Os metabólitos secundários microbianos possuem uma rica diversidade química e extensa atividade biológica, sendo considerados potenciais fontes de compostos para uso medicinal. Porém, muitos agrupamentos de genes biossintéticos permanecem silenciosos sob condições de cultura laboratorial, levando ao isolamento repetido de um grande número de compostos já conhecidos (PENG, 2021; SELEGATO; CASTRO-GAMBOA, 2023).

Uma abordagem que tenta mimetizar as condições naturais do habitat do microrganismo alvo é o co-cultivo, em que se espera que seja criada uma comunidade microbiana mais ou menos complexa, em que os microrganismos sejam expostos a múltiplos sinais químicos, trocados entre as diferentes espécies em cultivo (MARMANN et al., 2014). Usando um método orientado pela ecologia para ativar agrupamentos de genes silenciosos de microrganismos e explorar seu potencial metabólico e obter novos metabólitos secundários bioativos (PENG, 2021; SELEGATO; CASTRO-GAMBOA, 2023).

Diversos produtos naturais foram descobertos por estratégias de co-cultivo, estes novos compostos exibiram várias bioatividades, incluindo atividades antimicrobianas e potenciais atividade citotóxicas. Assim o co-cultivo se mostra como uma estratégia eficaz para explorar o potencial metabólico dos microrganismos, fornecendo diversas moléculas para a descoberta de compostos líderes e candidatos a medicamentos (PENG, 2021; SELEGATO; CASTRO-GAMBOA, 2023).

2.7.1 Microorganismos utilizados no co-cultivo

2.7.1.1 *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*

As bactérias do gênero *Bacillus* produzem substâncias capazes de inibir outros microrganismos, conhecidas como bacteriocinas (HENG et al., 2007).

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos que produz bacteriocinas e tem ação bacteriolítica ou bacteriostática sobre microrganismos patogênicos. A primeira bacteriocina descoberta foi a thuricina, que possui capacidade de inibir mais de 45 estirpes de *Bacillus thuringiensis* e espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AVIGNONE-ROSSA, MIGNONE., 1995; RASI, 2010).

Diversos produtos advindos do *Bacillus thuringiensis* se encontram entre os melhores inseticidas microbianos encontrados, diversos tipos de proteínas produzidas por esse bacilo possuem toxicidade comprovada contra uma grande variedade de insetos das ordens nematóides, ácaros, além de protozoários e também contra células cancerígenas humanas (BEL; FERRÉ; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 2020).

O *Bacillus megaterium* é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos, presente em diferentes habitats como solo, peixes, entre outros. Em seus produtos temos como exemplo proteínas como penicilina acilase, amilases, glicose desidrogenase, Utilizada também para a produção de piruvato, vitamina B12, toxinas fungicidas, etc (VARY et al., 2007).

Estudos relatam que o *B. megaterium* HgT21 possui o potencial de ser usado como modelo para o estudo de multirresistência a metais em bactérias Gram-positivas, devido a tolerância ao metal para metais como Níquel (Ni), Cádmiio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu) e Zinco (Zn), associada à biossorção e produção de sideróforos por *Bacillus megaterium* (GUZMÁN-MORENO et al., 2022).

Com base na capacidade de produção de bacteriocinas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, toxicidade contra insetos, e atividade contra células cancerígenas humanas, de *Bacillus thuringiensis*; e também produção de toxinas fungicidas por *Bacillus megaterium*, o co-cultivo se mostra como uma ferramenta de interesse para o aumento da bioatividade de *Paenibacillus terrae*, na inibição do crescimento das bactérias *Escherichia coli* (G-) e *Staphylococcus aureus* (G +), e fungo leveduriforme *Candida albicans*.

3. OBJETIVOS

Geral: Empregar os microrganismos *Paenibacillus terrae*, isolado endofiticamente de *Tabebuia* spp e também *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium* para detectar metabólitos de interesse biotecnológico.

Específicos:

- a) Realizar reativação e testar a viabilidade de *Paenibacillus terrae*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*;
- b) Avaliar o potencial antimicrobiano isoladamente de cada microrganismo e em co-cultivo;
- c) Verificar o perfil de resistência a agentes antibacterianos do endofítico *Paenibacillus terrae*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo dos inóculos bacterianos

As colônias teste, compostas pelas cepas ATCC (American Type Culture Collection) de G – *Escherichia coli* - ATCC 25922; G + *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923 e Fungo leveduriforme: *Candida albicans* – ATCC 10231, foram reativadas a partir da transferência de 100µL de cepas contidas em estoque, suspensas em uma solução de meio de cultura com glicerol a 20%, mantidas a uma temperatura de -80°C, em 5 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) e incubadas a 37°C por 24h (BONA et al., 2014; GASPAR et al., 2017; BARBOSA, SOUSA, 2023).

Os isolados, *Paenibacillus terrae*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*, foram reativados a partir da transferência de 100µL de cepas contidas em estoque, suspensas em uma solução de meio de cultura com glicerol a 20%, mantidas a uma temperatura de -80°C, em 5 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) para *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*, e em 5 mL de meio YPM para *Paenibacillus terrae* e incubadas a 37°C por 24h e a 28°C por 7 dias, respectivamente (BONA et al., 2014; GASPAR et al., 2017; BARBOSA, SOUSA, 2023).

As colônias foram repicadas antes de cada teste em duas placas e dois tubos para cada microrganismo, placas contendo o meio Ágar Triptona de Soja (TSA) e tubos de 5 mL de caldo triptona de soja (TSB) para *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*, e para

Paenibacillus terrae, placas e tubos contendo o meio YPM, caldo e ágar (BONA et al., 2014; GASPAR et al., 2017; BARBOSA, SOUSA, 2023).

4.1.1 Padronização

Todas as culturas foram padronizadas através de análise por espectrofotometria (DO 530 nm) em que a escala esperada estava contida entre 0,08 e 0,1; caso a medição da turvação fosse superior a 0,1, as culturas foram diluídas em solução salina 0,85% (CLSI, 2012; BONA et al., 2014; GASPAR et al., 2017; BARBOSA, SOUSA, 2023).

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por poço

Para o teste de difusão em ágar por poço, os três microrganismos teste, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, foram semeados separadamente em placas contendo meio de cultura ágar BHI com o auxílio de swabs esterilizados buscando uma cobertura uniforme. Em seguida, foram feitos três poços equidistantes de 9mm de diâmetro cada em todas as placas. Posteriormente, foram pipetados 100µL de cada isolado, *Paenibacillus terrae*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*, em triplicata para cada um dos microrganismos teste. Totalizando vinte e sete placas, três contra *E.coli* para os três isolados, três contra *S.aureus* para os três isolados e três contra *C.albicans* para os três isolados (BONA et al., 2014; GASPAR et al., 2017; BARBOSA, SOUSA, 2023).

Após o tempo de espera de absorção do líquido pelo meio de cultura, as placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas. Posteriormente, foi feita a medição dos halos de inibição em milímetros, com o auxílio de um paquímetro. Como os experimentos foram realizados em triplicata, o valor final obtido se trata da média dos halos observados.

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana em co-cultivo pela metodologia de difusão em ágar por poço

Para o co-cultivo, os inóculos foram preparados de forma diferente, os isolados foram incubados juntos. Sendo adicionados em 5mL de YPM líquido, 125µL de *P. terrae* juntamente com 125µL de *Bacillus thuringiensis* em dois tubos, e 125µL de *P. terrae* juntamente com 125µL de *Bacillus megaterium*, para outros dois tubos, sendo incubados a 28°C por 48 horas (BARBOSA, SOUSA, 2023).

Após o tempo de crescimento, o procedimento de montagem das placas se deu igual ao item 4.2, contando com um total de dezoito placas, três contra *E.coli* para os dois

co-cultivos, três contra *S.aureus* para os dois co-cultivos e três contra *C.albicans* para os dois co-cultivos (BARBOSA, SOUSA, 2023).

Após o tempo de espera de absorção do líquido pelo meio de cultura, as placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas. Posteriormente ao tempo de incubação a medição dos halos de inibição foi realizada da mesma forma que o item 4.2.

4.4 Perfil de resistência a agentes antibacterianos pela metodologia de difusão em ágar por disco.

Para o teste de disco-difusão, o isolado *P.terrae*, foi inoculado em placas contendo o meio de cultura ágar MH, com o uso de um swab esterilizado para uma cobertura uniforme do inóculo. Posteriormente à semeadura, foram colocados sobre a superfície de 4 a 6 discos de antibióticos por placa, com o auxílio de uma pinça esterilizada (CLSI, 2012; BONA et al., 2014; GASPAR et al., 2017; BARBOSA, SOUSA, 2023).

Os antibióticos utilizados para o teste foram amicacina (AK-30mcg), ampicilina (AMP-10mcg), carbenicilina (CA-100mcg), cefalotina (CFL-30mcg), cefepime (CM-30mcg), clindamicina (CI-2mcg), cloranfenicol (CLO-30mcg), eritromicina (EI-15mcg), gentamicina (GE-10mcg), nitrofurantoína (NT-30mcg), oxacilina (OX-1mcg), sulfazotrim (SUT-25mcg), teicoplanina (TE-30mcg) e tetraciclina (TT-30mcg).

As placas foram incubadas a 28°C, por 24 horas (BARBOSA, SOUSA, 2023). Posteriormente, foi feita a medição dos halos de inibição em milímetros, com o auxílio de um halômetro. O experimento foi realizado em triplicata, portanto o valor final obtido se trata da média dos valores medidos.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por poço

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados com o uso de três microrganismos teste, foi verificada a formação de halos de inibição nas placas de cultivo, e feita a medição dos mesmos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, dessa forma, a Tabela 1, apresenta a média dos valores obtidos na mensuração dos halos.

Os microrganismos teste escolhidos estão listados abaixo:

- *G- Escherichia coli* - ATCC 25923
- *G + Staphylococcus aureus* – ATCC 25922
- Fungo leveduriforme: *Candida albicans* – ATCC 10231

<i>Paenibacillus terrae</i>	
Microrganismos teste	DHalo-inibição mm
<i>Escherichia coli</i>	8,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,4
<i>Candida albicans</i>	11,4

Tabela 1: Média dos halos de inibição ($D_{\text{Halo-inibição}}$ mm) por *Paenibacillus terrae* contra microrganismos teste.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se nas Figuras 1, 2 e 3 que houve a formação de halos de inibição tanto para as *E. coli*, (Gram –) e *S. aureus*, (Gram +), apesar de se apresentarem menores e menos visíveis para *E coli*. Também observou-se positividade em *Candida albicans*, com medida dos halos maior que os demais, podendo indicar uma maior inibição ocasionada pelo *Paenibacillus terrae*. Esses resultados são condizentes com dados obtidos por Romano et al., (2014).

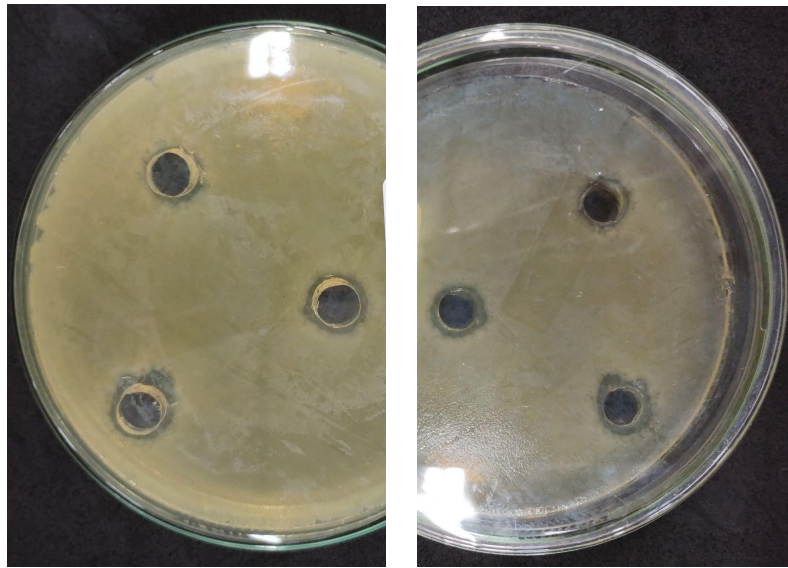


Figura 1: Inibição de *Escherichia coli* pelo microrganismo *Paenibacillus terrae*.

Fonte: Autoria própria

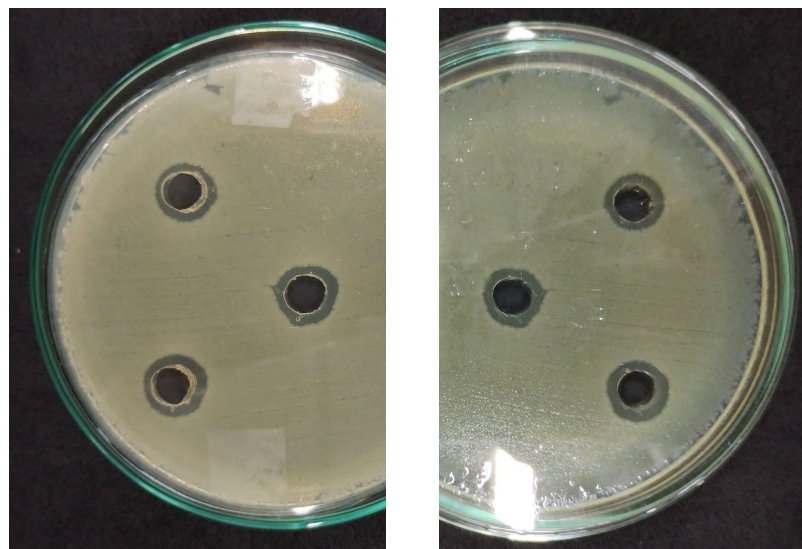


Figura 2: Inibição de *Staphylococcus aureus* pelo microrganismo *Paenibacillus terrae*.

Fonte: Autoria própria

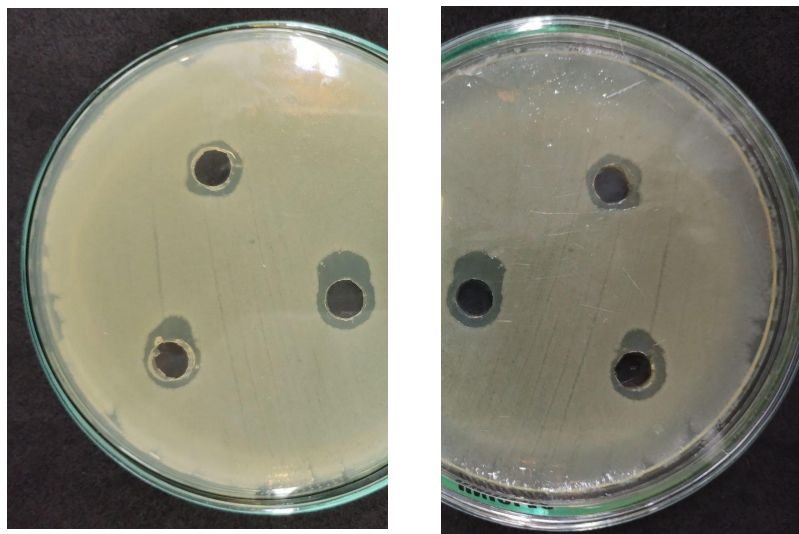


Figura 3: Inibição de *Candida albicans* pelo microrganismo *Paenibacillus terrae*.

Fonte: Autoria própria

Os outros isolados testados, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*, não apresentaram resultados positivos, não apresentando halos de inibição.

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em co-cultivo pela metodologia de difusão em ágar por poço

Para o co-cultivo o teste foi realizado da mesma forma, buscando avaliar a atividade antimicrobiana do *Paenibacillus terrae*, quando em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*. Fazendo o uso dos mesmos três microrganismos teste anteriores, e verificação da formação de halos de inibição nas placas de cultivo, com posterior medição dos mesmos, caso presentes. Novamente, todos os experimentos foram realizados em triplicata, constando na Tabela 2, a média dos valores obtidos na medição dos halos.

<i>Paenibacillus terrae</i> em co-cultivo com <i>Bacillus megaterium</i>	
Microrganismos teste	DHalo-inibição mm
<i>Escherichia coli</i>	10,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,5

Tabela 2: Média dos halos de inibição ($D_{\text{Halo-inibição}}$ mm) por *Paenibacillus terrae* em co-cultivo com *Bacillus megaterium* contra microrganismos teste.

Fonte: Autoria própria.

Notou-se que *Paenibacillus terrae* apresentou resultados melhores em co-cultivo com *Bacillus megaterium*, porém somente contra *E. coli* e *S. aureus*. Podemos observar também que os resultados foram mais significativos contra *E. coli*, apresentando um aumento de 2mm no tamanho do halo de inibição formado, enquanto para *S. aureus*, essa diferença foi de 0,1mm.

Em contrapartida, o co-cultivo de *Paenibacillus terrae* com *Bacillus megaterium*, contra *Candida albicans*, demonstrou o resultado inverso, não apresentando a formação de halos de inibição. O mesmo aconteceu com os testes de co-cultivo de *P. terrae* com *Bacillus thuringiensis*, contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, não havendo a formação de halos de inibição.

As Figuras 4 e 5 demonstram a formação de halos de inibição para o co-cultivo de *Paenibacillus terrae* com *Bacillus megaterium*, para bactérias utilizadas como teste que obtiveram um resultado positivo, *Escherichia coli*, Gram – e *Staphylococcus aureus*, Gram +.

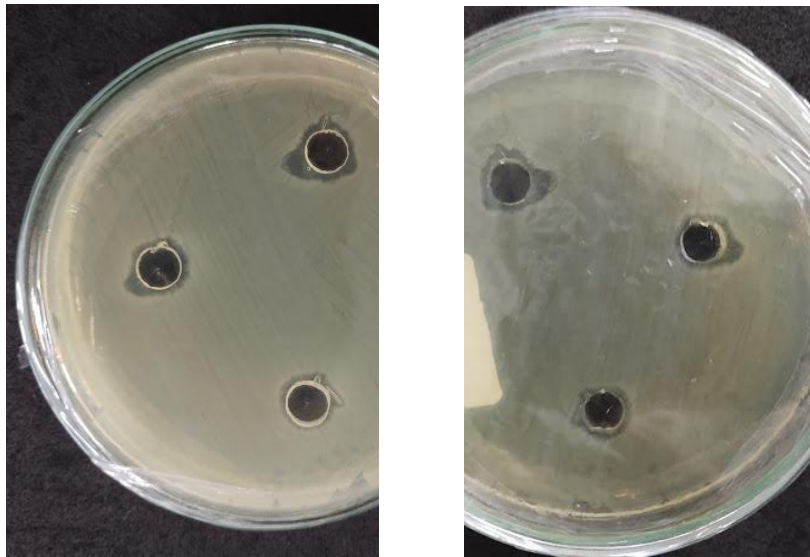


Figura 4: Inibição do crescimento de *E.coli* pelo co-cultivo de *Paenibacillus terrae* e *Bacillus megaterium*.

Fonte: Autoria própria

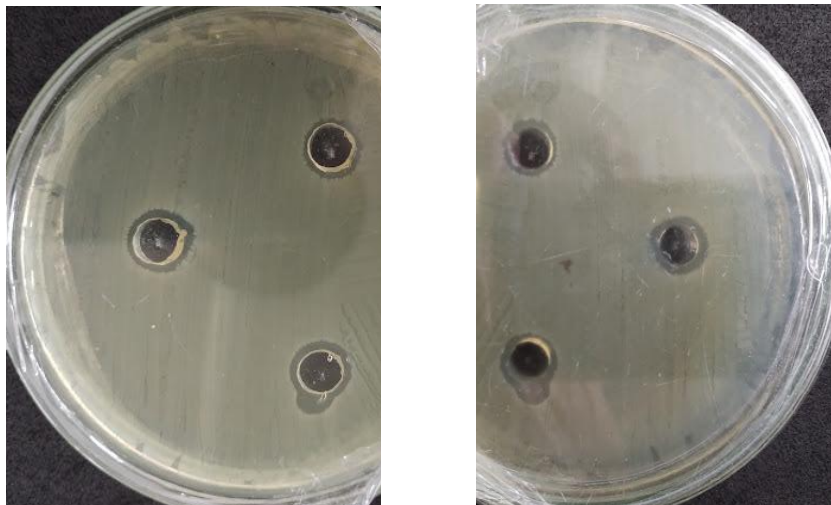


Figura 5: Inibição do crescimento de *S.aureus* pelo co-cultivo de *Paenibacillus terrae* e *Bacillus megaterium*.

Fonte: Autoria própria.

5.3 Perfil de resistência a agentes antibacterianos pela metodologia de difusão em ágar em disco.

A fim de avaliar o perfil de resistência do microrganismo *P.terrae* a agentes antibacterianos, foi realizado o teste com discos de antibiótico aplicados sobre a bactéria

estriada em placas de cultivo contendo o meio MH, buscando observar a formação de halos de inibição em volta dos antibióticos testados.

Posteriormente ao crescimento microbiano, foi observada a formação dos halos e a medição dos respectivos, que pode ser encontrada na Tabela 3, apresentada abaixo. Todos os testes foram realizados em triplicata, estando contido abaixo a média dos valores obtidos.

<i>Paenibacillus terrae</i>	
Antibióticos testados	DHalo-inibição mm
Amicacina (AK-30mcg)	22,25
Ampicilina (AMP-10mcg)	10
Carbenicilina (CA-100mcg)	-
Cefalotina (CFL-30mcg)	-
Cefepime (CM-30mcg)	14,16
Clindamicina (CI-2mcg)	-
Cloranfenicol (CLO-30mcg)	31
Eritromicina (EI-15mcg)	15,3
Gentamicina (GE-10mcg)	12,6
Nitrofurantoina (NT-30mcg)	16,16
Oxacilina (OX-1mcg)	-
Sulfazotrim (SUT-25mcg)	37,3
Teicoplanina (TE-30mcg)	8,6
Tetraciclina (TT-30mcg)	18

Tabela 3: Média dos halos de inibição ($D_{\text{Halo-inibição}}$ mm) por antibióticos, contra *Paenibacillus terrae*.

Fonte: Autoria própria.

Temos abaixo as Figuras 6, 7 e 8 demonstrando a formação de halos de inibição para os diferentes antibióticos testados.

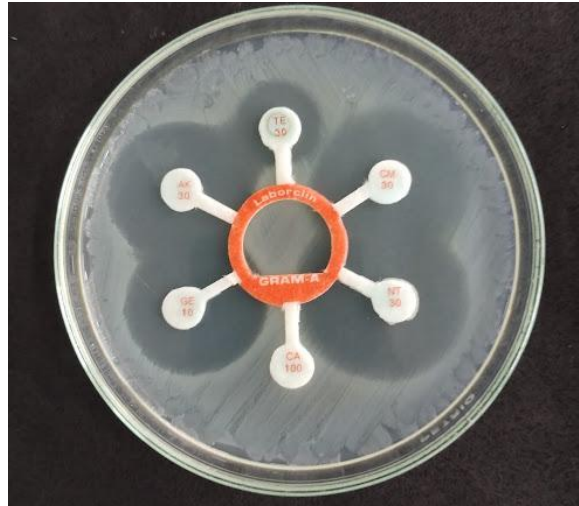


Figura 6: Inibição do crescimento de *Paenibacillus terrae* pelos antibióticos Amicacina (AK), Carbenicilina (CA), Cefepime (CM), Gentamicina (GE), Nitrofurantoina (NT) e Teicoplanina (TE).

Fonte: A autoria própria.

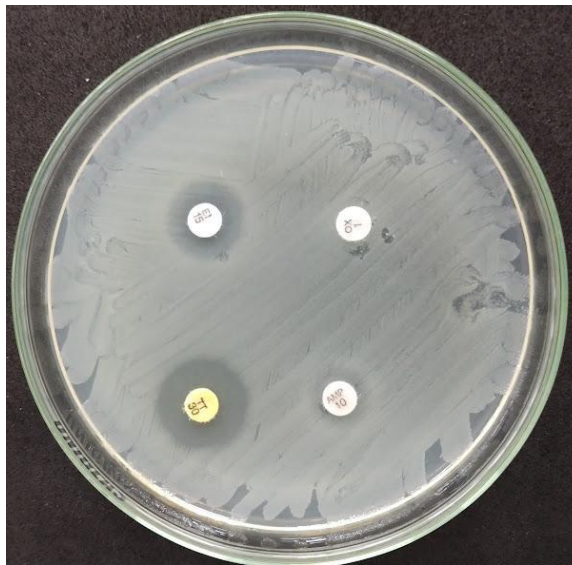


Figura 7: Inibição do crescimento de *Paenibacillus terrae* pelos antibióticos Ampicilina (AMP), Oxacilina (OX), Tetraciclina (TT) e Eritromicina (EI).

Fonte: A autoria própria.

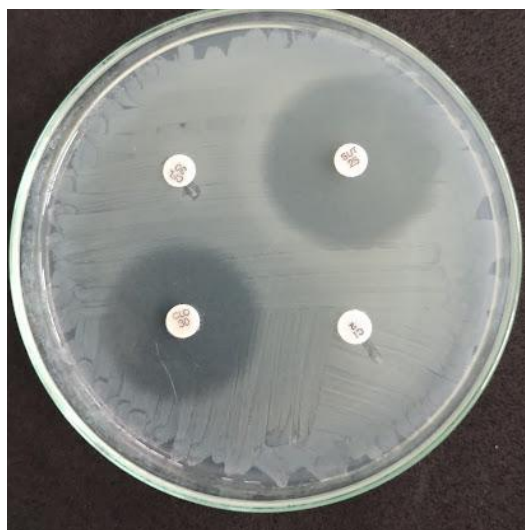


Figura 8: Inibição do crescimento de *Paenibacillus terrae* pelos antibióticos Cefalotina (CFL), Clindamicina(CI), Cloranfenicol (CLO) e Sulfazotrim (SUT).

Fonte: Autoria própria.

6. DISCUSSÃO

Ao observar os resultados obtidos podemos afirmar que a atividade antimicrobiana encontrada nos testes com a bactéria *Paenibacillus terrae*, constatando halos de inibição para *E.coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, estavam dentro do esperado, condizente com os estudos de LORENTZ et al (2006)., em que entre 55 isolados da água e do solo, pertencentes ao gênero *Paenibacillus*, 25 apresentaram atividade antibacteriana e 14 apresentaram atividade antifúngica. Resultados semelhantes apareceram no trabalho de LOHANS et al. (2014), onde a bactéria *Paenibacillus terrae*, demonstrou produção de compostos bioativos com a capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Coincidente também com os resultados obtidos por ROMANO (2014), no qual dos endofíticos isolados e identificados, o *Paenibacillus terrae*, foi o que gerou maiores halos de inibição contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e o fungo leveduriforme *Candida albicans*, e também com os estudos feitos por BARBOSA, SOUSA (2023), em que *Paenibacillus terrae*, ocasionou a inibição do crescimento dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e o fungo leveduriforme *Candida albicans*, com uma maior atividade contra *Candida albicans*.

Porém, ao contrário do esperado os *Bacillus thuringiensis*, e *Bacillus megaterium*, não apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados, apesar de serem

relatados na literatura como produtores de bacteriocinas e toxinas fungicidas (HENG et al., 2007). Este resultado pode ser, provavelmente, devido a inibição seletiva.

Para o co-cultivo, em que se esperava um aumento na bioatividade do *Paenibacillus terrae*, quando em contato com outros microrganismos, na tentativa de mimetizar as condições naturais de seu habitat, tais interações que contribuem para a produção de metabólitos secundários, foram obtidos resultados interessantes, para o co-cultivo de *Paenibacillus terrae* com *Bacillus megaterium*, um aumento na atividade foi realmente observado, podendo sinalizar para um maior pressão seletiva entre os microrganismos testados, gerando a presença de halos de inibição (PENG, 2021).

No entanto somente contra *E. coli* e *S. aureus*, havendo uma diferença maior para *E.coli*, podem ser explicados pela diferença de parede entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Já para o fungo leveduriforme, *C. albicans*, que havia obtido o melhor resultado, apresentando um maior halo de inibição quando testado somente com o *Paenibacillus terrae*, apresentou o resultado inverso no co-cultivo, não apresentando a formação de halos de inibição, possivelmente indicando que o potencial de inibição de *P. terrae* contra *C. albicans* tenha sido suprimido. O mesmo aconteceu com os testes de co-cultivo de *P.terrae* com *Bacillus thuringiensis*, não apresentando a formação de halos de inibição contra *E.coli*, *S. aureus* e *C. albicans*.

Tal resultado também pode ser esperado com o co-cultivo, que pode não só estimular a acumulação de diversas moléculas de microrganismos, mas também aumentar ou diminuir significativamente os rendimentos de alguns metabólitos secundários originais em comparação com a monocultura. Como demonstraram os estudos de Vinale et al. (2017), que isolou 5 compostos quando co-cultivou *Trichoderma harzianum* M10 derivado de casca de madeira compostada com o endófito *Talaromyces pinophilus* F36CF do galho de um medronheiro, alguns dos compostos isolados reduziram selectivamente a proliferação de células cancerígenas, alguns não foram influenciados pela estirpe F36CF, enquanto outros metabólitos originais da estirpe F36CF foram menos abundantes quando M10 estava presente (PENG, 2021).

Para o teste de resistência a antibióticos, foi observada susceptibilidade microbiana à maioria dos antibióticos testados, estando entre eles antibióticos de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram negativas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bioprospecção de endofíticos é essencial para a busca por metabólitos bioativos, visto que a produção de biomoléculas podem contribuir como agentes de biocontrole, inibição microbiana e parasitária, como anti-inflamatórios, na indústria, farmácia, medicina e biotecnologia.

O endofítico *Paenibacillus terrae*, se mostrou promissor para a realização de mais testes, por sua comprovada produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S.aureus* e *C. albicans*, e o aumento desta bioatividade quando em co-cultivo com *Bacillus megaterium*, e também por apresentar susceptibilidade a diversos antibióticos utilizados hoje em dia.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, poderiam ser realizadas análises para identificar e quantificar os metabólitos secundários produzidos por *Paenibacillus terrae*, e também procurar outras interações através do co-cultivo, em busca de uma bioatividade ainda maior. Além disso, também é possível explorar o potencial de *Paenibacillus terrae*, e do co-cultivo em diferentes áreas como o agronegócio, em busca de explorar o potencial desse endofítico como agente de biocontrole como descrito na literatura.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFZAL, I. et al. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological research**, v. 221, p. 36–49, 2019.
2. ALVES, H. C. et al. Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* Isolates and Novel Approaches to the Control of *E. coli* Infections. **Tech Open Science**, v. 1, p. 99-122, 2017.
3. AVIGNONE-ROSSA, C; MIGNONE, C. F. *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. Basic and applied considerations. **Mol Biotechnol**. 1995 doi: 10.1007/BF02907471. PMID: 8521040.
4. AZEVEDO, J. L. DE et al. Biotecnologia microbiana ambiental. Maringá: Eduem, 2018. 331 p. ISBN 978-85-7628-734-6.
5. BARBOSA , L. de C.; SOUSA , C. P. de. Bioprospecção da atividade antimicrobiana do caldo de fermentação produzido pelo endofítico *Paenibacillus terrae* em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*. **Seven Editora**, [S. l.], 2023.

Disponível em: <https://sevenpublicacoes.com.br/index.php/editora/article/view/1435>.
Acesso em: 10 aug. 2023.

6. BARRIOS-NOLASCO, Alejandro et al. Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract from *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC., Quercetin, and Anti-Obesity Drugs in Adipose Tissue in Wistar Rats with Diet-Induced Obesity. **Molecules**, v. 28, n. 9, p. 3801, 2023.
7. BECERRA-LUCIO, Angel A. et al. Diversity and interactomics of bacterial communities associated with dominant trees during tropical forest recovery. **Current Microbiology**, v. 78, p. 3417-3429, 2021.
8. BEL, Y.; FERRÉ, J.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: Functional Characterization and Mechanism of Action. **Toxins**, v. 12(12), 2020. doi:10.3390/toxins12120785
9. BONA, E. A. M. D. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, jul. 2014.
10. BOYCE, J. M.. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a Cause of Health Care--Associated Infection. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 46, n. 6, p.795-798, 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/528717>
11. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. **CLSI document M02-A11**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
12. CRUZ, F.P.N.; PAULA, A.F.; NOGUEIRA, C.T.; ANDRADE, P.H.M.; BORGES, L.M.; LACAVAL, P.T.; CAMARGO ILBC; ANIBAL, FF; SOUSA, C.P. Discovery of a Novel Lineage *Burkholderia cepacia* ST 1870 Endophytically Isolated from Medicinal *Polygala paniculata* Which Shows Potent In Vitro Antileishmanial and Antimicrobial Effects. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, p. 1-17, 2021.
13. DAS, G.; PATRA, J. K.; BAEK, K. Antibacterial Properties of Endophytic Bacteria Isolated from a Fern Species *Equisetum arvense* L. Against Foodborne Pathogenic Bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 14, n. 1, p.50-58, 2017. Mary Ann Liebert Inc.

14. DING, C. et al., The improvement of bioactive secondary metabolites accumulation in *Rumex gmelini* Turcz through co-culture with endophytic fungi, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 362–369, 2018.
15. EITEN, George. The cerrado vegetation of Brazil. **The Botanical Review**, v. 38, p. 201-341, 1972.
16. FERREIRA, Lucila Kawana Nunes et al. Plantas Medicinais do Cerrado dos Campos Gerais. **Biodiversidade Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 309-317, 2022.
17. GASPAR, E. B. et al. Comparação de Métodos para a Avaliação “in Vitro” de Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Pecuária Sul Bagé, RS, v. 40, n. 1, p. 4-23, 2017.
18. GÓMEZ, Omar Cabezas; LUIZ, Jaine Honorata Hortolan. "Endophytic fungi isolated from medicinal plants: future prospects of bioactive natural products from *Tabebuia/Handroanthus* endophytes." **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 21, p. 9105-9119, 2018.
19. GUDLAUGSSON, O. et al. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 9, p.1172-1177, 2003. Oxford University Press (OUP).
20. GUZMÁN-MORENO, Jesús et al. “*Bacillus megaterium* HgT21: a Promising Metal Multiresistant Plant Growth-Promoting Bacteria for Soil Bioremediation.” **Microbiology spectrum** v. 10,5, 2022
21. HALLMANN, J., et al. "Bacterial endophytes in agricultural crops." **Canadian journal of microbiology**, v. 43.10, p.895-914, 1997.
22. HAUSER, A.R. Antibióticos na prática clínica: fundamentos para a escolha do agente antimicrobiano correto, Porto Alegre, Artmed, 2009.
23. HENG, N.C.; BURTEISHAW, G.A.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 73, n.23, p. 7763–7766, Dec. 2007.
24. INÁCIO, Carlos A.; DIANESE, José C. Foliicolous fungi on *Tabebuia* species from the cerrado. **Mycological Progress**, v. 5, n. 2, p. 120-127, 2006.
25. KARLOWSKY, J. A. et al. Trends in Antimicrobial Resistance among Urinary Tract Infection Isolates of *Escherichia coli* from Female Outpatients in the United States. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p.2540-2545, 2002. American Society for Microbiology.

26. KIM, Ah-Young et al. *Paenibacillus terrae* AY-38 resistance against *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicum* L. plants through defence hormones regulation. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 244-253, 2017.
27. KLINK, Carlos A.; MACHADO, Ricardo B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.
28. KORB, A. et al. Perfil de Resistência da Bactéria *Escherichia coli* em Infecções do Trato Urinário em Pacientes Ambulatoriais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, São Cristóvão, v. 13, n. 1, p.72-79, 2013.
29. LIANG, Yan-Ling et al. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. **BioMed research international**, 2014.
30. LINDGREN, P. K.; KARLSSON, A.; HUGHES, D.. Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p.3222-3232, 2003. American Society for Microbiology.
31. LIU, Wen Zhi et al. *Paenibacillus terrae* NK3-4 Regulates the Transcription of Growth-related and Stress Resistance-related Genes in Rice. 2023.
32. LOCEY, K. J.; LENNON, J. T. Scaling laws predict global microbial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 21, p. 5970–5975, 2016.
33. LOHANS, Christopher T. et al. Biochemical, structural, and genetic characterization of tridecaptin A1, an antagonist of *Campylobacter jejuni*. **ChemBioChem**, v. 15, n. 2, p. 243-249, 2014.
34. LORENTZ, R. H. et al. Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 5, p. 541-547, 2006.
35. MACHADO, Ricardo B. Estimativa de perda da área do Cerrado brasileiro. 2016.
36. MACHADO, Ricardo Bomfim et al. Caracterização da fauna e flora do Cerrado. **Palestras do XI Simpósio Nacional sobre o Cerrado e II Simpósio Internacional sobre Savanas Tropicais**, p. 12-17, 2008.
37. MARMANN, A. et al. Co-Cultivation—A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p.1043- 1065, 17 fev. 2014. MDPI AG.

38. OSTROSKY, E. A. et al.. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, abr. 2008.
39. PALOU, J et al. Etiología y sensibilidad de los uropatógenos identificados en infecciones urinarias bajas no complicadas de la mujer (Estudio ARESC): implicaciones en la terapia empírica. **Medicina Clínica**, v. 1, n. 1, pp.1-7. 2011
40. PAPPAS, P. G. et al. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 5, p.634-643, 2003. Oxford University Press (OUP).
41. PENG, Xiao-Yue et al, Co-culture: stimulate the metabolic potential and explore the molecular diversity of natural products from microorganisms, **Marine Life Science & Technology**, v. 3, n. 3, p. 363–374, 2021.
42. RASI, G.C. Estudo de atividade de peptídeos tipo de bacteriocina de *Bacillus thuringiensis*. UnB – Instituto de Biologia – Pós-graduação em Biologia Molecular. Abril, 2010.
43. RATTE, J.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J.F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany** 60: p. 57-109, 2003.
44. ROMANO, Luis Henrique. Bioprospecção de microrganismos endofíticos isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e identificação da produção de metabólitos de interesse biotecnológico. 2014.
45. SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers In Medicine**, v. 3, 2016.
46. SANO, Edson Eyji et al. Mapeamento de cobertura vegetal do bioma Cerrado: estratégias e resultados. 2007.
47. SANTOYO, Gustavo, et al. "Plant growth-promoting bacterial endophytes." **Microbiological research**, v. 183, p. 92-99, 2016.
48. SATO, Ikuo, et al. "Suppressive potential of *Paenibacillus* strains isolated from the tomato phyllosphere against *Fusarium* crown and root rot of tomato." **Microbes and environments** v. 29.2, p. 168-177, 2014.
49. SCARIOT, Aldicir; FELFILI, Jeanine M.; SILVA, José Carlos Sousa. Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. 2005.

50. SEJAS, L. M. et al.. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 27–35, 2003.
51. SELEGATO, D. M. ; CASTRO-GAMBOA, I., Enhancing chemical and biological diversity by co-cultivation, **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.
52. SHIN, Sang Heum et al. Genome sequence of *Paenibacillus terrae* HPL-003, a xylanase-producing bacterium isolated from soil found in forest residue. 2012.
53. STELMASIEWICZ, Mateusz, et al. "Bioactive Compounds Produced by Endophytic Microorganisms Associated with Bryophytes—The “Bryendophytes”." **Molecules**, v. 28.7, 2023.
54. STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 7, p.491-502, 2003.
55. TANG, Tao et al. *Paenibacillus terrae* PY8 controls *Botrytis cinerea* and modifies the endophytic microbial community of the medicinal plant, *Paris polyphylla*. **Biological Control**, v. 169, p. 104888, 2022.
56. TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p.603-661, 2015. American Society for Microbiology.
57. VAN BELKUM, Marco J.; LOHANS, Christopher T.; VEDERAS, John C. "Draft Genome sequences of *Paenibacillus polymyxa* NRRL B-30509 and *Paenibacillus terrae* NRRL B-30644, strains from a poultry environment that produce tridecaptin A and paenicidins." **Genome Announcements** v.3.2, p. 10-128, 2015.
58. VARY, P. S. et al. *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76(5), p. 957–967, 2007. doi:10.1007/s00253-007-1089-3
59. VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. dos. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, 2017. Revista Brasileira de Análises Clínicas.
60. WERTHEIM, H. F. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p.751-762, dez. 2005. Elsevier BV.

61. WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Genebra: World Health Organization**, 2017.
62. WONG, E. S. et al. A 10-Year Review of Ocular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Cornea*, Maringá, v. 36, n. 1, p.92-97, 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
63. YOON, Jung-Hoon et al. *Paenibacillus kribbensis* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* sp. nov., bioflocculants for efficient harvesting of algal cells. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 295-301, 2003.
64. YU, Wen Qing et al. *Paenibacillus terrae* NK3-4: a potential biocontrol agent that produces β -1, 3-glucanase. **Biological Control**, v. 129, p. 92-101, 2019.