



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM  
POTENCIAL ANTIMICROBIANO ISOLADAS DE *THEOBROMA*  
*CACAO***

**Lívia Freitas da Silva Pinto**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof. Dr. Cristina Paiva de Sousa

***Coorientador:***

Prof. Dr. Adriana Carneiro Ribeiro

**São Carlos - SP  
2023**

**LÍVIA FREITAS DA SILVA PINTO**

**Bioprospecção de actinobactérias endofíticas com potencial antimicrobiano isoladas de *Theobroma cacao***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof. Dr. Cristina Paiva de Sousa

***Coorientador:***

Prof. Dr. Adriana Carneiro Ribeiro

BANCA EXAMINADORA

*Prof. Dr. Cristina Paiva de Sousa*  
*Presidente*

Departamento de Morfologia e Patologia - UFSCar

*Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva*  
Departamento de Genética e Evolução - UFSCar

*Prof. Dr. Sebastião Prata Vieira*  
Departamento de Física e Ciência dos Materiais - USP

São Carlos  
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Folha de aprovação**

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Mestrado da candidata Lívia Freitas da Silva Pinto, realizada em 20/10/2023:

---

Prof. Dr. Cristina Paiva de Sousa  
UFSCar

---

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva  
UFSCar

---

Prof. Dr. Sebastião Prata Vieira  
USP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação de mestrado à promoção dos estudos bacteriológicos, aos que buscam uma breve introdução acerca das actinobactérias e da importância de seus compostos bioativos, bem como aos pesquisadores e entusiastas que procuram novas fontes para a produção de agentes antimicrobianos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter permitido que eu tivesse saúde, determinação e persistência para a realização deste trabalho e por fazer com que meus objetivos pudessem ser alcançados.

Aos meus pais Mário José Moreira Pinto e Solange Freitas da Silva Pinto e ao meu irmão Fernando Freitas da Silva Pinto pelo perpétuo suporte, incentivo e compreensão, de infindáveis formas, quanto as minhas escolhas de vida e objetivos acadêmicos.

A professora Dra. Cristina Paiva de Sousa por aceitar conduzir meu projeto de pesquisa e por me orientar na realização das atividades referentes ao curso de mestrado.

A professora Dra. Adriana Carneiro Ribeiro pelo subsídio, correções e ensinamentos repassados, bem como pela coorientação e parceria.

A professora Dra. Elaine Maria Silva Guedes Lobato pelo suporte quanto ao preparo e realização da coleta dos vegetais de *Theobroma cacao* necessários para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao professor Dr. Nilson Veloso Bezerra por todos os conselhos, incentivos e contribuições em relação aos métodos aplicados no trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Edimara Lima dos Santos, Oscar Victor Cardenas Alegria e Taynara Cristina Santos Carvalho por colaborarem com a execução da parte prática do estudo e por auxiliarem no desenvolvimento do projeto.

A Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) por permitir que eu pudesse ingressar e participar do curso de mestrado em Biotecnologia.

A Universidade Federal do Pará (UFPA) por possibilitar a colaboração entre Universidades Federais e incentivar a realização dessa pesquisa.

A Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) por viabilizar e contribuir com os recursos necessários para realização da coleta de campo.

Pinto, Livia Freitas da Silva. **Bioprospecção de actinobactérias endofíticas com potencial antimicrobiano isoladas de *Theobroma cacao***. 2023. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023

## RESUMO

As actinobactérias constituem um dos maiores filos bacterianos e classificam-se como bactérias Gram-positivas, sendo onipresentes em ecossistemas aquáticos e terrestres. Elas são reconhecidas por sua capacidade na produção de metabólitos secundários com diferentes funcionalidades, dentre os quais se destacam os compostos bioativos com atividade antimicrobiana. O presente estudo realizou a bioprospecção e identificação de actinobactérias endofíticas isoladas de *Theobroma cacao* cultivados na região de Paragominas, Pará, Brasil e avaliou do potencial biotecnológico dessas cepas na produção de agentes antimicrobianos. Após o isolamento, foi possível verificar a presença de 11 bactérias endofíticas distintas. A identificação desses isolados, determinada por análise fenotípica e caracterização molecular, comprovou que 4 dos 11 pertenciam ao grupo das actinobactérias, sendo estes classificados a nível de gênero como *Microbacterium* (3 cepas) e *Curtobacterium* (1 cepa). Os demais isolados foram caracterizados como *Pseudomonas* (2 cepas), *Bacillus* (1 cepa), *Ralstonia* (1 cepa) e *Methilobacterium* (3 cepas). As 4 cepas do filo Actinobacteria foram submetidas ao teste de avaliação da atividade antimicrobiana. Todas elas inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* (diâmetros dos halos de inibição variaram de 2,3 a 3 cm), demonstrando serem eficazes contra essa bactéria Gram-Positiva. Contudo, elas não apresentaram atividade contra *Escherichia coli*.

**Palavras-chave:** Actinobactérias, Metabólitos secundários, Bioatividade, Atividade antimicrobiana.

Pinto, Livia Freitas da Silva. **Bioprospecting of endophytic actinobacteria with antimicrobial potential isolated from Theobroma cacao**. 2023. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023

#### **ABSTRACT**

Actinobacteria are one of the largest bacterial phyla and are classified as Gram-positive bacteria, being ubiquitous in aquatic and terrestrial ecosystems. They are recognized for their ability to produce secondary metabolites with different functionalities, including bioactive compounds with antimicrobial activity. This study carried out the bioprospecting and identification of endophytic actinobacteria isolated from *Theobroma cacao* grown in the region of Paragominas, Pará, Brazil and evaluated the biotechnological potential of these strains in the production of antimicrobial agents. After isolation, it was possible to verify the presence of 11 distinct endophytic bacteria. The identification of these isolates, determined by phenotypic analysis and molecular characterization, showed that 4 of the 11 belonged to the actinobacteria group, and these were classified at genus level as *Microbacterium* (3 strains) and *Curtobacterium* (1 strain). The other isolates were characterized as *Pseudomonas* (2 strains), *Bacillus* (1 strain), *Ralstonia* (1 strain) and *Methilobacterium* (3 strains). The 4 strains from the Actinobacteria phylum were tested for antimicrobial activity. All of them inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* (diameters of the inhibition halos ranged from 2.3 to 3 cm), proving to be effective against this Gram-positive bacterium. However, they showed no activity against *Escherichia coli*.

**Keywords:** Actinobacteria, Secondary metabolites, Bioactivity, Anti-bacterial activity.

## LISTA DE FIGURAS

	página
<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	
<b>Figura 1. 1</b> Ocorrência de microrganismos na rizosfera e migração para o rizoplano	15
<b>Figura 1. 2</b> Taxonomia do filo Actinobacteria	18
<b>Capítulo 2 – Materiais e Métodos</b>	
<b>Figura 2. 1</b> Localização de Paragominas no estado do Pará – Brasil	23
<b>Figura 2. 2</b> Plantação de cacau onde a coleta foi realizada	24
<b>Figura 2. 3</b> Divisão em quadrantes do vegetal para a realização da coleta	25
<b>Capítulo 3 – Resultados e Discussão</b>	
<b>Figura 3. 1</b> Características macroscópicas das diferentes colônias isoladas	35
<b>Figura 3. 2</b> Características microscópicas dos isolados	36
<b>Figura 3. 3</b> Marcador de peso molecular e fragmentos de DNA amplificados separados por eletroforese em gel de agarose	38
<b>Figura 3. 4</b> Árvore filogenética das sequências de 16S rRNA dos isolados e da base de dados do NCBI	39
<b>Figura 3. 5</b> Árvore filogenética das sequências de 16S rRNA dos isolados caracterizados como actinobactérias e uma cepa não pertencente a esse grupo	40
<b>Figura 3. 6</b> Cinética de crescimento da cepa CP3A01 ( <i>Curtobacterium</i> )	43
<b>Figura 3. 7</b> Cinética de crescimento da cepa CP3A02 ( <i>Microbacterium</i> )	44
<b>Figura 3. 8</b> Formação do halo de inibição da cepa CP3A01 frente a <i>S. aureus</i>	45
<b>Figura 3. 9</b> Medição do diâmetro dos halos de inibição formado pelas actinobactérias isoladas frente a <i>S. aureus</i> no teste de difusão em ágar	45



## LISTA DE TABELAS

**página**

### **Capítulo 3 – Resultados e Discussão**

<b>Tabela 3. 1</b>	Quantidades de colônias isoladas nas diferentes amostras	32
<b>Tabela 3. 2</b>	Características macroscópicas das colônias isoladas	34
<b>Tabela 3. 3</b>	Características microscópicas dos isolados a partir do método de Gram	36
<b>Tabela 3. 4</b>	Provas bioquímicas realizadas nas cepas Gram-positivas	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMR	<i>Antimicrobial resistance (resistência antimicrobiana)</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection (Coleção de microrganismos Norte Americana)</i>
BHI	<i>Braint Heart Infusion (Caldo Infusão de Cérebro Coração)</i>
CEPLAC	<i>Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)</i>
ISP-2	<i>International Streptomyces Project-2 Medium (Projeto Internacional Streptomyces-2 médio)</i>
MDR	<i>Multidrug resistance (resistência à múltiplas drogas)</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima)</i>
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
PBPs	<i>Penicillin Binding Proteins (Proteínas ligadoras de Penicilina)</i>
TSA	<i>Teste de Sensibilidade a antimicrobianos</i>

### Lista de nucleotídeos:

C	Citosina	A	Adenina
T	Timina	G	Guanina

# SUMÁRIO

	página
<b>Resumo</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Lista de Figuras</b>	
<b>Lista de Tabelas</b>	
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b>	
<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	<b>11</b>
1.1 Antimicrobianos e resistência bacteriana	11
1.2 Bioprospecção de microrganismos	13
1.3 Microrganismos endofíticos	14
1.4 Metabólitos secundários	16
1.5 Actinobactérias	17
1.6 Justificativa	20
1.7 Objetivos	21
1.7.1 Gerais	21
1.7.2 Específicos	22
<b>Capítulo 2 – Materiais e Métodos</b>	<b>23</b>
2.1 Área de estudo	23
2.2 Coleta das amostras	24
2.3 Isolamento das bactérias endofíticas	27
2.4 Caracterização morfológica dos isolados	26
2.5 Testes Bioquímicos	27
2.6 Caracterização molecular	28
2.6.1 Extração do DNA	28
2.6.2 Amplificação da região 16S do gene rRNA	29
2.6.3 Reação de sequenciamento	29
2.6.4 Análise das sequências e construção da árvore filogenética dos isolados	29
2.7 Cinética de crescimento	30
2.8 Avaliação do potencial antimicrobiano das actinobactérias	30
<b>Capítulo 3 – Resultados e Discussão</b>	<b>32</b>
3.1 Isolamento das bactérias endofíticas	32
3.2 Caracterização morfológica macroscópica e microscópica dos isolados	33
3.3 Identificação das actinobactérias	37
3.3.1 Testes bioquímicos	37
3.3.2 Caracterização Molecular	38
3.4 Cinética de crescimento	42
3.5 Avaliação do potencial antimicrobiano das actinobactérias	44
<b>Capítulo 4 – Conclusão</b>	<b>47</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>48</b>

## Capítulo 1 – Introdução

### 1.1 Antimicrobianos e resistência bacteriana

As bactérias são organismos procariontes e unicelulares que surgiram no planeta Terra há cerca de 3,5 bilhões de anos, em um ambiente completamente hostil com altíssimas temperaturas, radiações ultravioletas, tempestades e falta de nutrientes. Elas foram identificadas pela primeira vez por Antony Van Leeuwenhoek por volta dos anos 1670, após sua própria invenção, o microscópio. Porém, somente no século XIX surgiram estudos acerca da possibilidade desses microrganismos serem causadores de processos infecciosos (DUARTE et al., 2019).

O grande marco histórico da criação dos antibióticos ocorreu em 1928, quando Alexander Fleming, biólogo e médico inglês, visualizou em suas culturas bacterianas de *Staphylococcus* o crescimento de um fungo do gênero *Penicillium* e ao redor dele havia um espaço sem crescimento bacteriano. Essa observação sugeriu que o referido fungo possuía alguma substância que impedia o crescimento das bactérias (TAPIA, 2019).

Além disso, Fleming observou que esse fungo não inibia apenas o crescimento do gênero *Staphylococcus*, mas também de muitas outras bactérias de importância clínica, descobrindo assim, o primeiro antibiótico da humanidade, a penicilina. A partir dessa descoberta, foi possível pela primeira vez combater bactérias que causavam infecções responsáveis pela taxa de mortalidade tão alta à época, salvando, sobretudo, inúmeras vidas de soldados na 2ª guerra mundial (OLIVEIRA; PEREIRA; ZAMBERLAM, 2020).

De forma geral, define-se antimicrobianos como fármacos de origem natural, semissintética ou sintética, com a propriedade de suprimir o crescimento de bactérias ou destruí-las (COSTA; SILVA JÚNIOR, 2017). De acordo com a definição de origem grega, a palavra antibiótico, sendo “anti” (contra) e “bio” (vida), é um composto que possui a finalidade de combater a vida bacteriana (VIEIRA; VIEIRA, 2017).

Os antibióticos têm trazido inegavelmente um benefício para a sociedade humana na luta contra as bactérias (MAHTABUDDIN et al., 2021), reduzindo mundialmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Entretanto, o uso indiscriminado e irresponsável desse

medicamento nos mais diversos setores (humano, veterinário, agrícola, dentre outros), de forma terapêutica ou profilática, tem favorecido a pressão seletiva em diversas cepas bacterianas (CONTRUCCI et al., 2019). Esse cenário contribui para a predominância de espécies microbianas cada vez mais resistentes, resultando na resistência aos antimicrobianos (AMR) (DUARTE et al., 2019), globalmente (LARKIN, 2023).

Em geral, o termo “resistência bacteriana” refere-se à capacidade de um microrganismo em impedir um agente antimicrobiano específico de causar danos sobre ele, fazendo com que a resposta clínica se torne ineficaz quando utilizado no tratamento de doenças infecciosas. A resistência microbiana pode estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou diferentes populações e é transferida por mecanismos diversos (VIEIRA; VIEIRA, 2017).

Antes do século XXI a resistência bacteriana acontecia principalmente em hospitais; atualmente, ela está agregada a vários meios e pode chegar aos indivíduos saudáveis. Especificamente, a resistência aos antimicrobianos acontece quando a bactéria expressa genes que permitem a mediação no mecanismo de ação do antibiótico por transmutação espontânea de DNA ou por modificação e transmissão de plasmídeos (TEIXEIRA; FIGUEIREDO; FRANÇA, 2019).

Por isso, muitos desses medicamentos tornaram-se ineficazes em diversos tratamentos e trouxeram inúmeros problemas aos pacientes, profissionais de saúde e órgãos públicos (OLIVEIRA et al., 2020). As bactérias resistentes a medicamentos e multidrogas (MDR) têm sido reconhecidas por governos e cientistas como um dos problemas de saúde mais urgentes do planeta (BUTLER; PETERSON, 2020; LARKIN, 2023).

As MDR são responsáveis por complicações clínicas e consequências negativas na economia, devido a hospitalização prolongada e ao uso de antibióticos diferentes dos de primeira linha. Os custos dos cuidados de saúde também aumentam, o que é um problema relevante, considerando os recursos finitos que sustentam os sistemas de saúde no Brasil e no mundo (LOUREIRO et al., 2016).

Indubitavelmente, o conhecimento científico evoluiu de forma significativa ao longo dos anos, mesmo assim infecções desencadeadas primariamente por bactérias ainda persistem em ser uma das principais causas de morbidade e letalidade no

mundo todo. A elevação do número de bactérias resistentes a antibióticos tem tornado os tratamentos caros e impactado os custos com saúde. Em função disso, o desenvolvimento de novos antimicrobianos deve ser contínuo, pois a eficácia de um antibiótico é temporária, visto que a resistência é inevitável com o passar dos anos (BRITO; TREVISAN, 2021).

## **1.2 Bioprospecção de microrganismos**

Desde seus primórdios, o ser humano utiliza recursos naturais (BOGAS et al., 2022) para as mais diversas finalidades (CRUZ et al., 2021), em particular na forma de medicamentos, alimentos, cosméticos, e defensivos agrícolas. As atividades de descoberta, descrição e utilização de espécies de animais, plantas e microrganismos são parte intrínseca da história (BERLINK, 2012). A bioprospecção é a mais antiga das atividades humanas e pode ser definida como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos e processos provenientes de seres vivos em geral, que possam ter um potencial econômico e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto (BELL; MAGESTE; TAKETANI, 2020).

Por décadas até os dias de hoje, os cientistas realizam bioprospecção em microrganismos para a descoberta de novos gêneros que produzam compostos bioativos diversificados, já que eles exibiram muitas aplicações úteis para a humanidade (LEE; GOH; CHAN, 2020). Os microrganismos são amplamente utilizados na produção de substâncias químicas, como antibióticos, antitumorais e imunossupressores (MORAIS et al., 2014; TORRES et al., 2022).

Desta forma, os microrganismos são agentes importantes como fonte de produtos naturais para diversos setores, incluindo a indústria farmacêutica e a biotecnologia. Grande parte dos produtos utilizados atualmente são derivados de microrganismos e podem ser utilizados nos mais diversos setores. Essa capacidade em produzir compostos bioativos, por sua vez, está relacionada mais frequentemente a grupos específicos de bactérias e microrganismos eucarióticos. No grupo dos procaríotos destacam-se as actinobactérias, as pseudomonas e as cianobactérias (MORAIS et al., 2014; CRUZ et al., 2021; TORRES et al., 2022).

As actinobactérias são uma fonte muito prolífica na produção de metabólitos secundários bioativos. Esse grupo microbiano apresenta complexidade estrutural

diversa, amplo espectro bioativo, incluindo atividade antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária e imunossupressora. Assim, as actinobactérias continuam a desempenhar papel crucial na prospecção de biomoléculas para utilização em biotecnologia (LEE; GOH; CHAN, 2020) e medicina (BOGAS et al., 2022; BARBOSA e SOUSA, 2023).

### 1.3 Microrganismos endofíticos

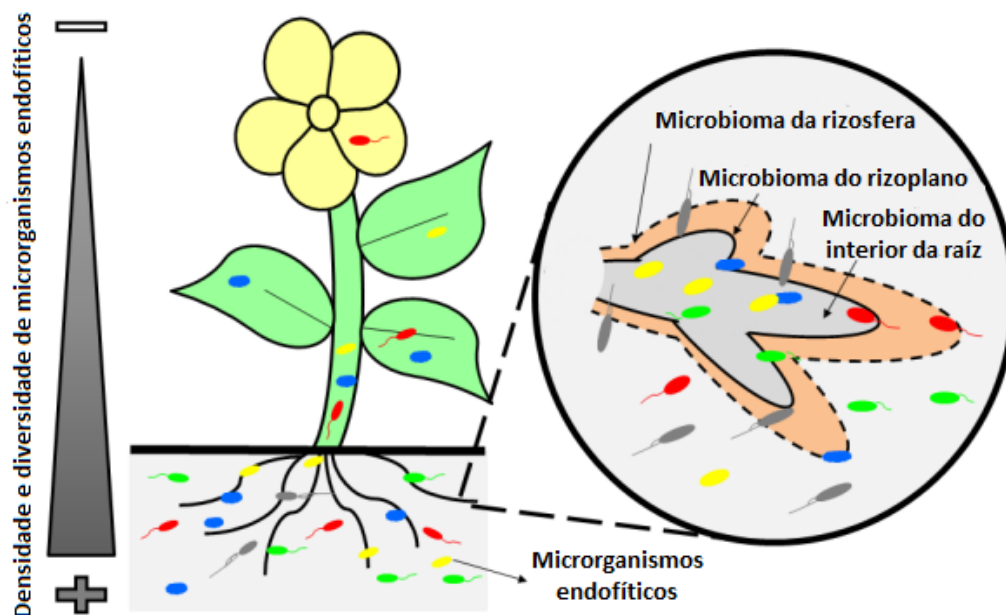
Define-se microrganismos endofíticos como seres que, em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, habitam no interior de tecidos vegetais sem causar nenhum dano aparente à planta ou sinal externo de infecção (VILLAS BOAS et al., 2020). O termo endófito é derivado de duas palavras gregas: '*endon*' = dentro e '*phyton*' = planta, e foi utilizado pela primeira vez por De Bary em 1866 para denotar todos os microrganismos residentes dentro das plantas saudáveis vivas, distinguindo-se dos epifíticos, os quais vivem na superfície (LATA et al., 2018).

Esses microrganismos, sejam eles bactérias, fungos ou protozoários, são encontrados em uma grande variedade de estruturas de vegetais, como sementes, óvulos, frutas, caule, raiz, folhas, tubérculo e casca. É possível isolar centenas de espécies de endofíticos de uma única planta e dentre estes, pelo menos um, geralmente, apresenta especificidade de hospedeiro. Entretanto, diversas espécies de microrganismos endofíticos são capazes de colonizar vários hospedeiros pertencentes a famílias diferentes em um dado local geográfico, sinalizando uma ampla habilidade adaptativa (VILLAS BOAS et al., 2020).

O estudo da biodiversidade dos microrganismos endofíticos é pouco explorado. No entanto, com base em pesquisas já desenvolvidas, estima-se que existem mais de 250.000 diferentes espécies de plantas e 1 milhão de endofíticos no mundo. Quase todas as plantas contêm endófitos, incluindo cultivares como plantações de beterraba, milho, soja, trigo e arroz; ou plantas selvagens como carvalho, álamo, abeto e musgos (VASILEVA et al., 2018).

Os microrganismos endofíticos originam-se a partir da existência de um microbioma ambiental, provenientes da rizosfera ou filosfera. O meio de entrada mais comum utilizado por eles é através do solo, por aberturas naturais ou feridas localizadas nas raízes (Figura 1.1). Além disso, a transferência dos endófitos ocorre

entre a planta materna e seus descendentes, por transmissão vertical via sementes ou através da propagação vegetativa. Dessa maneira, os endófitos apresentam a capacidade de se disseminar sistematicamente pelo hospedeiro vegetal, habitando desde vasos condutores ao apoplasto (BORAZZO; MANGOLIN; MACHADO, 2021).



**Figura 1.1** Ocorrência de microrganismos na rizosfera e migração para o rizoplasma, interior da raiz e restante da planta (SANTOS et al., 2018), modificado.

As bactérias endofíticas residem preferencialmente nos espaços intercelulares dos tecidos vegetais. Comunidades bacterianas de vários órgãos se sobrepõem em grande parte. Os endófitos da zona radicular são representados por bactérias do filo Proteobacteria (aproximadamente 50% da comunidade), Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (10% da comunidade cada). Uma vez que o método de colonização endofítica é a penetração de bactérias na raiz vegetal e sua maior disseminação é através de vasos xilemáticos ou espaços intercelulares, não é de surpreender que Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria sejam dominantes também em caules e folhas (VASILEVA et al., 2019).

De forma geral, os microrganismos endofíticos contribuem com a planta hospedeira a partir da produção de diversos metabólitos, tanto primários como secundários, que auxiliam na promoção do crescimento vegetal e no controle biológico de inúmeras doenças. Os metabólitos secundários são valiosos agentes na medicina e



na agricultura e proporcionam uma série de benefícios a humanidade. Os compostos produzidos por endofíticos tem a capacidade de apresentar diferentes atividades biológicas, dentre as quais, podem-se destacar potenciais antimicrobianos, antiparasitários, antioxidantes, citotóxicos e controle de pragas (AMORIM; ORLANDELLI; PAMPHILE, 2019).

#### **1.4 Metabólitos secundários**

Os organismos produzem uma larga e diversa ordem de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários estão envolvidos nas funções básicas da vida celular e possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Já os metabólitos secundários ou produtos secundários são compostos que aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento do produtor, pois este pode sobreviver mesmo sem a sua formação (SINGH et al., 2019).

Os metabólitos secundários são produzidos quando cessa o crescimento do organismo produtor, ou seja, na fase estacionária de crescimento. Por isso, eles não são essenciais para o seu desenvolvimento e reprodução. Entretanto, quando o resultado desse metabolismo é um produto favorecedor da sobrevivência eles são incorporados às reações primárias. Além do mais, ao se esgotar um nutriente vital, o metabolismo secundário mantém os mecanismos essenciais para a multiplicação celular, ativando outras vias para a sua produção (FUMAGALI et al., 2008).

A produção de metabólitos secundários bioativos é uma vantagem competitiva. Em geral, os principais efeitos desses metabólitos são a defesa, regulação e comunicação (OLIVEIRA et al., 2019). Suas composições químicas e funções fisiológicas são diversas. Eles podem funcionar como vitaminas, cofatores, hormônios, feromônios, fragrâncias, neurotransmissores e corantes. Além disso, suas funções biológicas e celulares inerentes são extremamente diversificadas, podendo modular a transcrição celular, multiplicação, transferência de genes e indução de resistência e virulência (BÉRDY, 2012).

Desde a sua descoberta nos anos 1920, os metabólitos secundários apresentam um importante impacto na saúde humana, na nutrição e na sociedade como um todo. Já foram utilizados para inúmeras aplicações como antiparasitários, antimaláricos,

imunossupressores, anticâncer e antimicrobianos (PURVES et al., 2016). Nos últimos anos, o interesse em acessar a biodiversidade microbiana levou à descoberta de inúmeros microrganismos e produtos derivados de seu metabolismo nos mais variados habitats (PHAMPHILE et al., 2017).

Os microrganismos são fontes facilmente renováveis e reprodutíveis quando comparadas a outras fontes naturais como plantas e animais. Em 2002, mais de 22.000 compostos bioativos haviam sido descobertos a partir de microrganismos. Dentre eles, destacam-se antibióticos produzidos por actinobactérias (45%), fungos (38%), e bactérias unicelulares, principalmente por *Pseudomonas* e *Bacillus* (17%). Alguns dos fármacos provenientes de microrganismos que abastecem a indústria farmacêutica são as penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, monobactamas, tetraciclina, aminoglicosídeos, entre outros (SPECIAN et al., 2014)

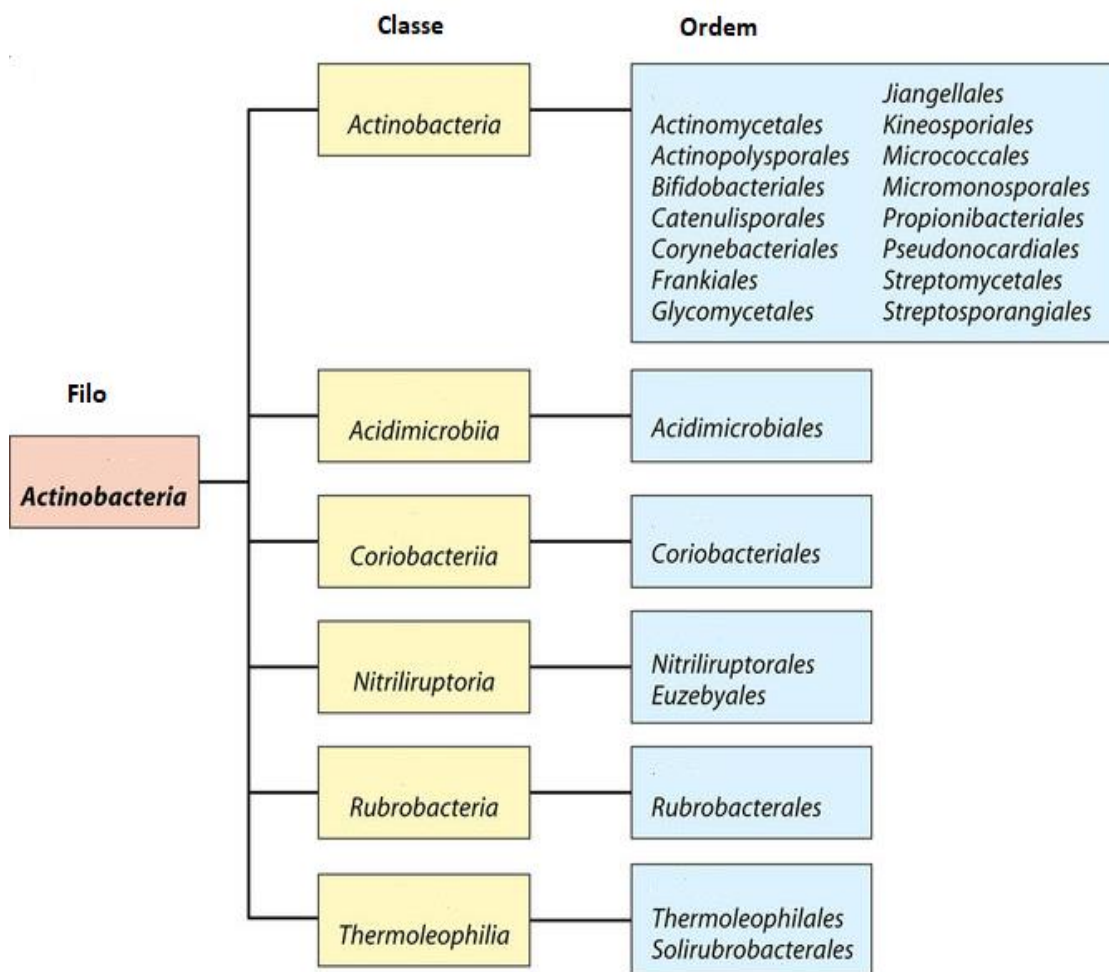
As bactérias demonstram ser uma fonte rica de produtos naturais (WEIL; BRADY, 2016). Elas têm sido bastante estudadas quanto a produção de compostos bioativos, principalmente a Classe Actinobacteria. Essa classe contribui com mais da metade dos compostos presentes no banco de dados de literatura de antibióticos. Grande parte desses produtos bioativos é produzido por actinobactérias do gênero *Streptomyces*, responsável por 80% dos produtos naturais derivados desse grupo (MENEZES, 2015).

### **1.5 Actinobactérias**

As actinobactérias têm uma longa história evolutiva e existem no planeta há cerca de 2,7 bilhões de anos, sendo associadas a colonização precoce da Terra. Estão entre as linhagens mais primitivas de procariontes (MORENO et al., 2020). A primeira descrição desses microrganismos ocorreu no final do século XIX e durante um longo período foram caracterizados como fungos por apresentarem características típicas de crescimento filamentosos. Porém, estudos realizados a partir de 1950 possibilitaram um melhor conhecimento das suas estruturas genéticas e das composições químicas, os quais confirmaram sua natureza procariótica (AMARAL et al., 2020).

Esse grupo de bactérias representa uma das maiores unidades taxonômicas e está entre as 18 linhagens principais atualmente reconhecidas dentro do domínio das bactérias, possuindo 5 subclasses, 6 ordens e 14 subordens. A taxonomia das

actinobactérias evoluiu significativamente ao longo do tempo com o acúmulo de conhecimento (BARKA et al., 2016). O filo Actinobacteria é delimitado com base em sua posição de ramificação na árvore filogenética a partir do gene do rRNA 16S e é dividido em 6 classes: Actinobacteria, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria e Thermoleophilia. A classe Actinobacteria contém 16 ordens (Figura 1.2) e 43 das 53 famílias do filo Actinobacteria, enquanto as outras 5 classes juntas contêm apenas 10 famílias (NOUIOUI et al., 2018).



**Figura 1.2** Taxonomia do filo Actinobacteria (GAO; GUPTA, 2012), modificado.

Ademais, estruturalmente, as actinobactérias contêm uma membrana fosfolipídica e camadas espessas de peptidoglicano, sendo classificadas como bactérias Gram positivo. Possuem, ainda, em seu genoma altas concentrações de guanina e citosina (G+C). Além disso, exibem grande diversidade morfológica e funcional, caracterizando-se pela presença de hifas com cadeias de esporos típicas e

produção de pigmentos melanoides. Geralmente, são encontradas em solo terrestre, mais especificamente na rizosfera e em tecidos internos de plantas, e ecossistemas marinhos. Contudo, devido sua versatilidade metabólica, apresentam capacidade de crescer em temperaturas elevadas e sobreviver em ambientes hostis, o que possibilita a sua distribuição nos mais diversos ecossistemas (BRANCO et al., 2019).

Em geral, essa categoria de microrganismos produz elementos filamentosos em forma de micélio, semelhantes a hifas fúngicas (SILVA et al., 2019). Em algumas espécies, a reprodução ocorre pela formação de esporos, esporangiósporos e conidiósporos. Os esporos constituem a sua principal forma de multiplicação e podem auxiliar na sobrevivência durante o período de estiagem por serem resistentes a dessecações. Em outras espécies, como as do gênero *Nocardia*, a reprodução ocorre por meio da fragmentação das hifas em muitas células baciliformes e cocoides, cada uma capaz de formar um novo micélio (OLIVEIRA et al., 2014).

A maioria das actinobactérias são aeróbias, heterotróficas e utilizam fontes de carbono orgânico, que é aproveitado desde as moléculas mais simples até as mais complexas não decompostas por fungos e bactérias como: fenóis, quitina, parafina e húmus. Além do mais, possuem funções significativas em todas as instâncias como, por exemplo, importantes agentes no ciclo global do carbono e do nitrogênio (*Frankia* spp.), probióticos em humanos e animais, patógenos de humanos, animais e plantas (*Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp.) e produtores de enzimas e metabólitos clinicamente importantes (*Streptomyces* spp.) (LAW et al., 2020; BARBOSA e SOUSA, 2023).

Até 2010, cerca de 34 mil compostos bioativos haviam sido extraídos de microrganismos e pelo menos 40% deles são produzidos por actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces*. Aproximadamente 10 mil substâncias produzidas por actinobactérias exibem atividade antimicrobiana ou antitumoral. Outrossim, a maioria dos antimicrobianos já utilizados em medicina humana e veterinária ou agricultura são derivados naturais ou semissintéticos de substâncias produzidas por elas. Esses dados destacam a importância e a potencial aplicação prática das substâncias antimicrobianas advindas das actinobactérias, notadamente no controle de microrganismos patogênicos (GOMES; DUARTE; BASTOS, 2017).

## 1.6 Justificativa

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que no ano de 2050, caso não sejam tomadas medidas efetivas para controlar os avanços da resistência bacteriana aos antimicrobianos, 10 milhões de pessoas irão morrer por ano devido a ocorrência de infecções por microrganismos resistentes, 1 a cada 3 segundos. Esse número superaria a mortalidade relacionada ao câncer, atualmente com 8 milhões de óbitos por ano (NOGUEIRA, 2017).

Nesse contexto, novas biomoléculas e estratégias são urgentemente necessárias para combater a disseminação de patógenos resistentes a antibióticos. Embora um progresso considerável esteja ocorrendo nos campos de síntese química e biossíntese de compostos antimicrobianos, a natureza ainda é a fonte mais rica e versátil para prospecção de novos antibióticos, sendo os produtos microbianos naturais um importante destaque (MANIVASAGAN et al., 2014).

Entre os microrganismos, o filo *Actinobacteria* possui grande visibilidade e versatilidade quanto a produção de biocompostos com atividade antimicrobiana (ZHAO et al., 2018). Atualmente, cerca de 80% dos antibióticos de origem microbiana são derivados de actinobactérias, o que auxilia significativamente na saúde e bem-estar das pessoas (SALWAN; SHARMAN, 2020).

Apesar da grande contribuição das actinobactérias na produção de antibióticos, o avanço desenfreado da resistência bacteriana é notório. Por isso, nichos e regiões ecológicas pouco exploradas têm sido buscadas como fontes de novas actinobactérias e antimicrobianos, além de outros agentes biologicamente ativos e úteis (QUIN et al., 2016).

Ademais, a procura por nichos ecológicos de actinobactérias pode levar à identificação de novos agrupamentos de genes e, portanto, novos produtos. Os pesquisadores agora estão concentrados no isolamento de actinobactérias em diversos habitats como oceanos, ambientes extremos e tecidos internos de plantas (SALWAN; SHARMAN, 2020).

Durante séculos, as plantas foram extensivamente utilizadas como fontes de compostos para fins medicinais. Nos últimos tempos, foi demonstrado que microrganismos associados a elas produzem também compostos bioativos de alto

valor terapêutico (SINGHE; DUBEY, 2018). A bioprospecção de microrganismos endofíticos tem sido considerada um recurso promissor na busca por novas biomoléculas (BORAZZO; MANGOLIN; MACHADO, 2021).

A diversidade cultural das actinobactérias endofíticas associadas a plantas tropicais nativas é essencialmente inexplorada (JANSO; CARTER, 2010). Nesse sentido, a utilização de monoculturas comerciais dos trópicos, tal como a de cacau (*Theobroma cacao*), seria de grande relevância para o estudo desse grupo de endófitos (AMORIM; ORLANDELLI; PAMPHILE, 2019).

O cacau é uma commodity de alto valor econômico mundial e o Brasil é o sétimo maior produtor do planeta, com uma área colhida de 704.122 hectares e uma produção de 273.793 toneladas. Até novembro de 2020, a receita nacional de exportação dos produtos de cacau somou US\$ 276 milhões (LAVANHOLE et al., 2019). A região Nordeste ocupa 69,7% da área nacional de cultivo de cacau, porém é a região Norte quem lidera a produção do país (53,2%) (BRAINER, 2021).

Outrossim, esse cultivo está submetido a compostos químicos de origens variadas para a promoção de crescimento e qualidade vegetal. Além disso, em seus tecidos internos estão presentes diversos microrganismos, tanto patogênicos quanto endofíticos (BRAGA; DOMENE; GANDARA, 2019). Por sua vez, os endófitos são capazes de sintetizar compostos com potencial atividade antimicrobiana, que os permite sobreviver nesse nicho ecológico (RODRIGUES et al., 2018).

Deste modo, torna-se extremamente necessário o incentivo a busca de actinobactérias em novos nichos ecológicos, incluindo os tecidos internos das plantas, para que se possa descobrir novas fontes de substâncias que auxiliem no desenvolvimento de antimicrobianos.

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 Geral**

Prospectar actinobactérias endofíticas produtoras de compostos bioativos com potencial antimicrobiano provenientes de *Theobroma cacao*, coletados em Paragominas-Pará.

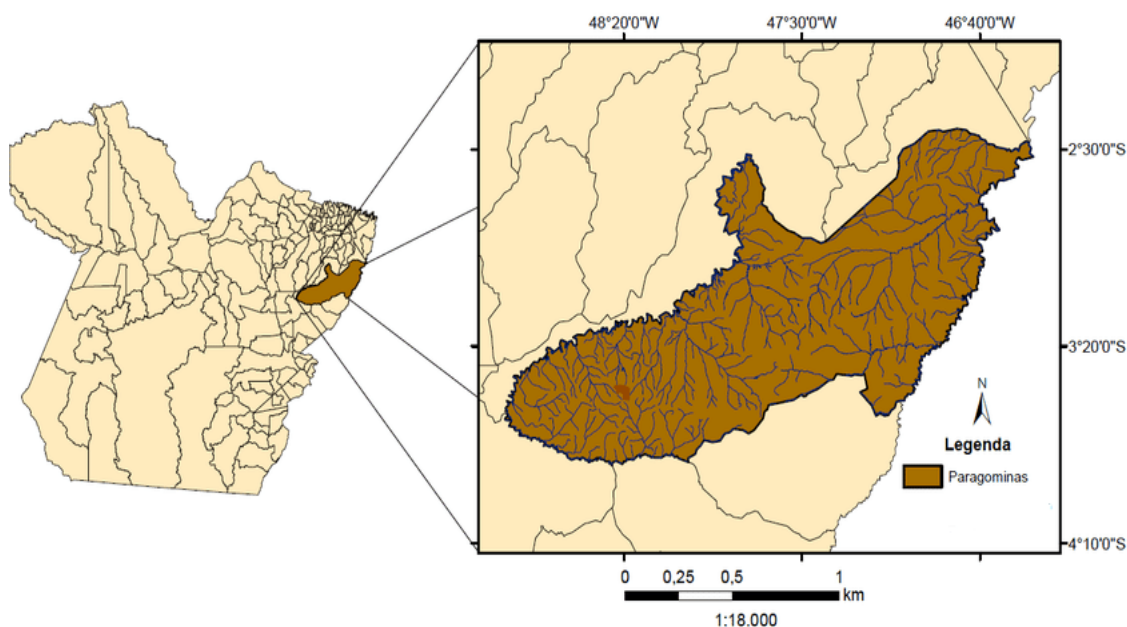
### 1.7.2 Específicos

- Isolar bactérias endofíticas advindas de folhas e fragmentos de caule de *Theobroma cacao*;
- Determinar a presença de actinobactérias endofíticas mediante análise das características fenotípicas e métodos moleculares;
- Avaliar a produção de compostos bioativos com potencial antimicrobiano das actinobactérias endofíticas isoladas.

## Capítulo 2 – Materiais e Métodos

### 2.1 Área de estudo

O presente estudo foi conduzido no município de Paragominas, localizado na mesorregião sudeste do estado do Pará – Brasil (Figura 2.1). O referido município localiza-se a 306 km de Belém, capital do Estado, e possui uma área de 19.330 Km<sup>2</sup>. (GIULIATTI et al., 2019). Paragominas possui uma população estimada pelo IBGE (2018) em 110.026 habitantes e é um polo tradicional de uma grande região, na qual as principais atividades são rurais, sendo a pecuária, com cerca de 490.000 ha de pastagens, e a agricultura.



**Figura 2.1** Localização de Paragominas no estado do Pará – Brasil (SILVA et al., 2018), modificado.

Quanto a cultura de cacau, o estado do Pará é o maior produtor do país, contribuindo com quase 50% da safra nacional. A região da transamazônica é responsável por 77% da produção estadual e apresenta um dos sistemas mais competitivos do mundo (IBGE/SIDRA/LSPA, 2018). O município de Paragominas produz cerca de 240 toneladas de cacau por ano, com expectativa de chegar a aproximadamente 1 milhão de toneladas em cinco anos. Atualmente, 127 produtores cultivam o fruto em solo paragominense (BESSA et al., 2019).

O cacauzeiro (*Theobroma cacao*) é uma planta perenifólia e frutífera da família *Malvaceae*. Se cultivada em plantação, a altura de um cacauzeiro de três anos atinge



1,8 - 3,0 metros e aos 12 anos de idade pode atingir 4,50 - 7,0 metros (TABARES et al., 2021). Nos primeiros anos, o cacaeiro apresenta a casca do caule lisa; mais tarde torna-se áspera e rugosa. Além disso, uma das propriedades especiais da folha de cacau é que ela possui duas articulações que auxiliam na capacidade das folhas em realizarem movimentos para ajustarem-se à direção da luz solar (NOVITA; BASRI, 2021).

Neste trabalho, as amostras foram coletadas em uma plantação de *Theobroma cacao* pertencente à propriedade Boa Esperança (2°59'37" 'S e 47°44'44" O). Essa plantação divide-se em duas áreas distintas: plantio de cacau a pleno sol (6.713 m<sup>2</sup>) e plantio de cacau sombreado (3.981 m<sup>2</sup>), com uma distância de 34 m entre as áreas (Figura 2.2). Os cacaeiros em estudo possuem em média 2-3 anos de idade e foram plantados a partir das sementes advindas da Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira (CEPLAC).



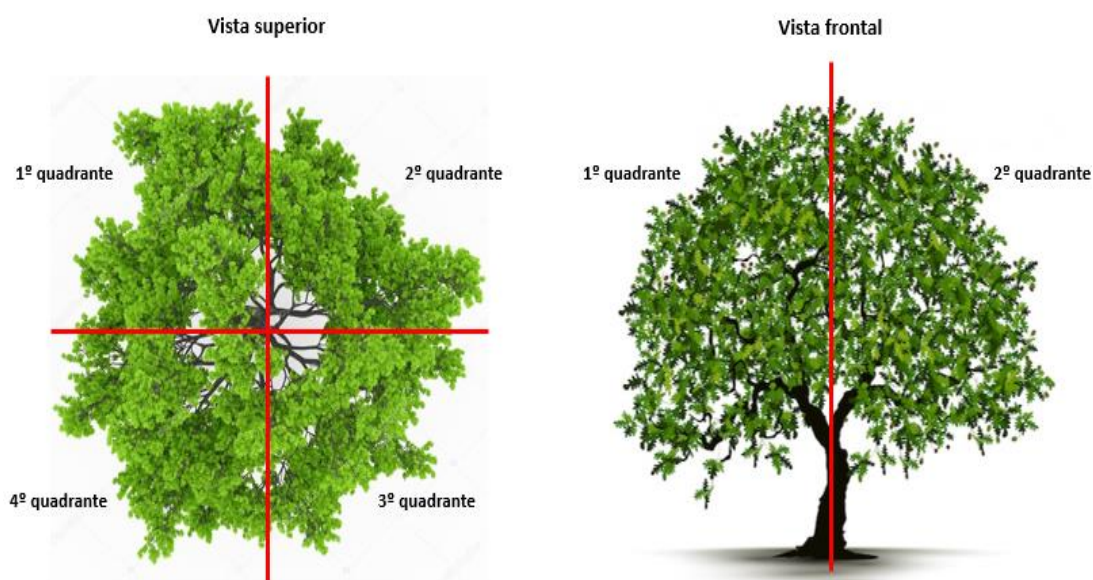
**Figura 2.2** Plantação de cacau onde a coleta foi realizada. Área de plantio à pleno sol (A) e área de plantio sombreado (B) (Próprio autor).

## 2.2 Coleta das amostras

Para a realização deste trabalho foram utilizados folhas e fragmentos de caule de seis vegetais de *Theobroma cacao*, sendo três vegetais referentes ao plantio à pleno

sol e os outros três situados em plantio sombreado (coleta em triplicata). As plantas coletadas foram escolhidas de maneira aleatória, porém respeitando os seguintes critérios de inclusão: I) apresentarem-se aparentemente saudáveis, II) sem manchas ou III) qualquer tipo de lesão causada por insetos ou danos mecânicos e IV) cada ponto selecionado deveria estar, no mínimo, a cinco metros de distância dos demais. A coleta das folhas e dos fragmentos de caule ocorreu a partir da escolha de ramificações inteiras, mantendo-se o cuidado para danificar o mínimo possível o tecido.

Do ponto de vista superior, o vegetal foi dividido em duas linhas imaginárias concorrentes, resultando na divisão da planta em quatro quadrantes (Figura 2.3). Em seguida, foi realizada uma contagem da base para o ápice e escolhido o terceiro ramo de cada um dos quatro quadrantes para a efetivação da coleta (VIÉGAS et al., 2022). O material coletado, a partir da utilização de instrumento perfurocortante previamente esterilizado, foi devidamente identificado e armazenado em sacos descartáveis esterilizados e acondicionados em caixas térmicas a 4 °C (GOLINSKA et al., 2015) e transportados, o mais breve possível, ao Centro de Genômica e Biologia de Sistemas (CGBS) da Universidade Federal do Pará (UFPA) para o processamento analítico.



**Figura 2.3** Divisão em quadrantes do vegetal para a realização da coleta (<https://pt.depositphotos.com>), modificado.

### 2.3 Isolamento das bactérias endofíticas

Para o isolamento destas bactérias, foi efetuado um *pool* de folhas e fragmentos de caule de cada vegetal. Em seguida, cada *pool* sofreu um pré-tratamento baseado em uma lavagem superficial em água corrente das folhas e caules, seguido de secagem em papel absorvente. Após esse processo, foi realizado a imersão sequencial em: álcool 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio 2% por 4 minutos, álcool 70% por 30 segundos e lavagem em água destilada esterilizada por 3 vezes (SINGH et al., 2022).

A água destilada utilizada na lavagem final para descontaminação foi colocada em incubação, a fim de descartar o crescimento de microrganismos epifíticos. Posterior ao processo de anti-sepsia, 25 g dos fragmentos dos tecidos foram macerados em 225 ml de solução salina (0,85%). O macerado foi agitado a 200 rpm por 15 minutos e deixado em repouso por mais 15 minutos para a difusão das bactérias na solução (BARRETTI et al., 2009). Em seguida, a solução obtida foi filtrada em filtro de papel (100% celulose) e foram realizadas diluições decimais seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$ ) em tubos de ensaio contendo solução salina (JABBOROVA et al., 2020).

As bactérias foram isoladas a partir do sobrenadante resultante e de suas diluições. O isolamento foi realizado pelo método de esgotamento em estrias em dois meios de cultura distintos: ágar Extrato de levedura-extrato de Malte (ISP-2) e caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), visando a obtenção de uma maior diversidade de actinobactérias. Foi adicionado Nistatina (1 $\mu$ L/ml) nos meios de cultura para inibição de crescimento fúngico. As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica por 25 dias à temperatura de  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com observação visual diária do crescimento bacteriano (GOLINSKA et al., 2015).

### 2.4 Caracterização morfológica dos isolados

Após o tempo de incubação, as colônias foram caracterizadas macroscopicamente e microscopicamente. A caracterização macroscópica incluiu a análise do tamanho, forma, borda, transparência, brilho, cor, textura, elevação e consistência das colônias (FITRI et al., 2020). Do ponto de vista microscópico, os isolados selecionados foram avaliados a partir do método de coloração de Gram, a fim de verificar a pureza da cultura, se os microrganismos eram Gram positivos ou Gram

variáveis e ainda se eles se apresentavam na forma filamentosa ou se fragmentavam em bacilos, cocos ou cocobacilos (SANTOS et al., 2019).

## 2.5 Testes bioquímicos

A caracterização bioquímica foi realizada através das seguintes provas: produção de catalase, crescimento a partir de citrato como principal fonte de energia, capacidade de formar ácido fenil pirúvico por meio da fenilalanina, fermentação de carboidratos, produção de Sulfeto de Hidrogênio e produção de gás carbônico. As metodologias utilizadas para as provas bioquímicas foram adaptadas do livro *Berguey's Manual of Systematic Bacteriology* (GOODFELLOW et al., 2012).

Para a análise da produção de catalase foi realizada a retirada da colônia em estudo do meio de cultura com crescimento prévio. Em seguida, colocou-se a colônia sobre uma lâmina de vidro e foi adicionado uma gota de  $H_2O_2$  a 3%. Caso for observado o aparecimento de bolhas a prova é considerada positiva, se não houver mudanças no esfregaço realizado a prova é, então, negativa. O princípio deste teste fundamenta-se na presença da enzima catalase, a qual processa o  $H_2O_2$ , agindo como mecanismo de defesa da célula (ISLAM et al., 2020).

O teste de Citrato de *Simmons* é indicado para determinar a capacidade de certas bactérias em utilizarem o citrato como única fonte de carbono em seu metabolismo. O ágar citrato de *Simmons* contém citrato de sódio como única fonte de carbono e o azul de bromotimol como indicador de pH. Quando a bactéria utiliza o citrato, este é removido do meio e  $CO_2$  é liberado. O  $CO_2$  combina-se com o sódio, do citrato de sódio e água para formar carbonato de sódio, um produto alcalino. Isto aumenta o pH, mudando a cor do meio de verde (negativo) para azul (positivo). As bactérias foram inoculadas em meio inclinado em linha reta e foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas (DHABAAN, 2019).

O ágar Fenilalanina busca determinar a capacidade de um microrganismo em desaminar a fenilalanina para ácido fenilpirúvico através da presença da enzima fenilalanina desaminase. O procedimento dessa prova consiste na semeadura em zig-zag em tubo inclinado, seguido de incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após decorrido o tempo indicado deve ser adicionado  $FeCl_3$  a 10% para a revelação do teste. Em uma reação positiva, qualquer ácido fenilpirúvico presente

reage com o sal férrico no reagente para dar uma cor verde ao meio. Caso o meio não mude a coloração a prova é negativa (PROCOP et al., 2018).

A fermentação de carboidratos, produção de H<sub>2</sub>S e produção de gás carbônico foi avaliada por meio da prova *Triple Sugar Iron* (TSI). O ágar TSI fornece uma série de reações bioquímicas que dão uma visão geral do metabolismo bacteriano. É um meio sólido distribuído de tal forma que apresenta uma base e uma inclinação. O meio foi semeado com agulha na base e estrias na superfície e incubado a uma temperatura de 37°C durante o período de 24 horas (SALO; NOVERO, 2020).

## 2.6 Caracterização Molecular

### 2.6.1 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio líquido ISP-2 com incubação em *Shaker* horizontal a 28° C e 200 rpm durante o período de cinco dias (ARUMUGAM et al., 2017). Após o crescimento, 2 ml de cada tubo de cultivo foi transferido para um *ependorf*. Posteriormente, foi realizada a etapa para a concentração e facilitação da quebra da parede celular das cepas isoladas. Essa etapa consistiu em um processo baseado em três fases principais: I) centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos dos tubos *ependorf*; II) descarte do sobrenadante; III) adição, em cada *ependorf*, de 1 ml do caldo ISP-2 com crescimento, referente ao cultivo inicial. Esse procedimento foi realizado três vezes (BRATBAK; DUNDAS, 1998).

A extração do DNA genômico total das bactérias foi realizado a partir do método Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico, de acordo com um protocolo anterior relatado (WILSON, 2001). Para a medição da qualidade e quantidade de DNA foi utilizado o aparelho NanoDrop (ND-2000cThermo Scientific), o qual avalia variáveis de concentração de DNA e índice de pureza (ALEGRÍA et al., 2020). A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e Brometo de etídio a 0,5 µg/ml (VOYTAS, 2001), onde foram aplicados 3µl dos DNA's extraídos e 2µl do revelador *BlueJuice*<sup>TM</sup> Gel *Loading Buffer* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Como marcador foi utilizado Plus DNA Ladder (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) com peso molecular de 1 kB (THOMPSON; STEINMANN, 2010).

### 2.6.2 Amplificação da região 16S do gene rRNA

A amplificação da região 16S do gene rRNA foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os *primers* universais utilizados foram 8F (5'-AGAGAGTTTGATCCTCCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). As amostras continham o volume total de 30 µL de misturas de reação, incluindo 15 µl GoTaq® Green Master Mix a 1X (Promega), 11,8 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura de DNA, 0,6 µl de cada *primer* a 0,1 mM e 2 µl de DNA, seguindo as instruções do fabricante. As reações de amplificação foram submetidas ao Termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems) programado com as seguintes condições de ciclismo: I) uma desnaturação inicial em 95°C durante 5 minutos, II) 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, III) 55°C durante 1 minuto e IV) 72°C durante 1 minuto, e V) uma etapa final de extensão de 72°C durante 10 minutos (ALVES et al., 2020).

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e Brometo de Etídio a 0,5 µg/ml, onde foram aplicados 5 µl dos DNA's, juntamente com o marcador de peso molecular 1kb DNA *Ladder* para a observação do fragmento de aproximadamente 1500 pb amplificado em fotodocumentador com luz ultravioleta (THOMPSON; STEINMANN, 2010).

### 2.6.3 Reação para sequenciamento

As amostras de PCR foram enviadas a empresa ACTGene - Análises moleculares LTDA para purificação e sequenciamento pelo método de Sanger. Os produtos purificados foram submetidos ao sequenciamento no equipamento 3500 *Sanger Genomic Analyzer* (Applied Biosystems). Foram empregados os *primers* universais 8F e 1492R, os mesmos utilizados na PCR de todas as amostras.

### 2.6.4 Análise das sequências e construção da árvore filogenética dos isolados

A qualidade das sequências foi analisada utilizando-se o programa BioEdit 7.0.5 (HALL, 1999). Além disso, com o mesmo software as sequências foram alinhadas a partir de ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Após o alinhamento, as sequências foram comparadas com o banco de dados público GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio da ferramenta BlastN e as bases nitrogenadas foram manualmente editadas (ALTSCHUL et al., 1997).

No desenvolvimento da árvore filogenética foi utilizado, inicialmente, o software J Model Test 2.1.10 (DARRIBA et al., 2019) a fim de selecionar o melhor método estatístico e modelo para a construção da árvore. Em seguida, com auxílio do programa MEGA 11.0.10 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*), escolheu-se o método *Maximum Likelihood* e o modelo Tamura 3 para a realização, com melhor desempenho, do desenho da filogenia (DEY; SINGH, 2010).

## 2.7 Cinética de crescimento

Para a análise do período de produção de metabólitos secundários e padronização do inóculo a ser utilizado no teste subsequente, os isolados foram submetidos a análise da curva de crescimento. O crescimento microbiano foi mensurado pela metodologia de quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (BREWSTER, 2003).

Foram inoculados, em média, três colônias de cada uma das actinobactérias isoladas em *Erlenmeyer* contendo 300 ml de caldo ISP-2. Em seguida, os inóculos foram inseridos em *shaker* horizontal a 28° C e 200 rpm (ARUMUGAM et al., 2017). A cada 2 horas, uma alíquota de 2 ml foi retirada para ser utilizada na realização das diluições seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$ ) em solução salina (0,85%). Após a realização das diluições, 100 µl de cada amostra diluída foi semeada, com auxílio da alça de Drigalski, em placas de Petri contendo ágar ISP-2. As placas foram incubadas a 28° C por 72 horas. Os resultados das quantificações foram expressos em log UFC.ml<sup>-1</sup> (ZWIETERING et al., 1990).

## 2.8 Avaliação da atividade antimicrobiana das actinobactérias

No presente estudo, a metodologia empregada para a avaliação do potencial antimicrobiano das actinobactérias foi o teste de difusão em meio sólido, realizado em triplicata. A testagem ocorreu para demonstrar o perfil de sensibilidade das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* - advindas da *American Type Culture Collection* (ATCC) - frente as actinobactérias isoladas (UESUGI et al., 2021). Essa

sensibilidade é demonstrada pela presença do halo de inibição ao redor de um poço preenchido com meio sólido acrescido de colônias de actinobactérias.

Para o desenvolvimento desta metodologia, foram utilizadas placas de Petri contendo ágar *Mueller-Hinton*. Nas referidas placas foram adicionados ao meio de cultura um inóculo bacteriano, a partir de uma suspensão direta, em solução salina, de colônias isoladas referente as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC-0023) e *Escherichia coli* (ATCC-0022). A suspensão foi ajustada para que a sua turbidez coincidissem com a da solução padrão de 0,5 da escala de McFarland (MARTINS et al., 2022).

Após a distribuição desse inóculo pelo método de distensão, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro no meio de cultura. Em cada poço foi adicionado meio sólido ISP-2 com crescimento de colônias de actinobactérias. Essas placas foram levadas a estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas para posterior visualização das colônias bacterianas e verificação da formação do halo inibição (ZOTHANPUIA et al., 2018).



## Capítulo 3 – Resultados e Discussão

### 3.1 Isolamento das bactérias endofíticas

Foram obtidas 19 colônias bacterianas endofíticas das seis amostras coletadas, sendo 14 (73,68%) destas referentes aos três cacauzeiros cultivados à pleno sol e 5 (26,32%) isoladas do plantio em área sombreada. Houve o crescimento entre 1 a 7 colônias por amostra advindas de todos os vegetais coletados, exceto da amostra 4 que não apresentou nenhum crescimento. A biocarga bacteriana identificada foi de até  $6,3 \times 10^3$  UFC/g (Tabela 3.1), existindo diferenças significativas entre os dois grupos ( $t$  test= 4,943;  $p$  value= 0,004).

**Tabela 3.1** Quantidades de colônias isoladas nas diferentes amostras

Área de plantio	Vegetal	Número de colônias isoladas	UFC/g
À pleno sol	1	5	$4,5 \times 10^3$
	2	2	$1,8 \times 10^3$
	3	7	$6,3 \times 10^3$
Sombreado	4	0	0
	5	3	$2,7 \times 10^3$
	6	2	$1,8 \times 10^3$

A quantidade de colônias isoladas em área de plantio à pleno sol foi consideravelmente superior. Essa situação poderia ser vinculada aos fatores ambientais, tais como luz solar e umidade, os quais afetam a produção de biomoléculas originadas de microrganismos e, por conseguinte, alteram o microbioma endofítico (AFZAL et al., 2019; PODOLICH et al., 2015).

Inúmeros fatores podem influenciar a colonização e promover flutuações populacionais de bactérias endofíticas, incluindo locais de origem, genótipo da planta hospedeira, volume do inóculo e as próprias condições ambientais (MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Andrade (2020) avaliou a ocorrência de bactérias endofíticas de *Cattleya walkerina* em 3 ambientes distintos (natureza, casa de vegetação e *in vitro*). O referido autor obteve diferentes índices de Shannon-Wiener (método utilizado para medir a diversidade em dados categóricos) nos ambientes estudados, constatando a interferência das condições ambientais na comunidade microbiana endofítica.

Além disso, o número de isolados no presente trabalho foi menor do que o reportado na pesquisa de Alsultan e colaboradores (2019), que consistiu no isolamento de até 12 bactérias endofíticas em cada amostra de folhas. Apesar disso, a carga bacteriana encontrada foi variada se comparada a outros estudos. No trabalho de Vera-Loor e colaboradores (2021) encontraram-se semelhantes valores em tecidos de flor e semente de cacau, contudo existem reportes de maior carga bacteriana em cacau (MELNICK et al., 2008).

Ademais, a maior quantidade e diversidade de microrganismos com capacidade endofítica está presente no solo, e as raízes são a porta de entrada para que estes microrganismos consigam migrar em direção a diferentes partes da planta (ROBINSON et al., 2015; NALINI; PRAKASH, 2017). Portanto, nos tecidos foliares superiores encontra-se uma menor quantidade desses microrganismos; porém eles apresentam uma capacidade de adaptação especializada (SANTOS et al., 2018).

No estudo de Mardiah (2018), realizado em uma plantação de dendê, foram isoladas ao todo 126 colônias de bactérias endofíticas. No entanto, apenas 12 colônias foram isoladas de caules e folhas, a maioria delas foram obtidas a partir das raízes. Por outro lado, a atividade antifúngica testada contra *Ganoderma boninense* foi mais relevante nos isolados de tecidos superiores da planta, o que corrobora com os dados encontrados na literatura e com os achados deste trabalho.

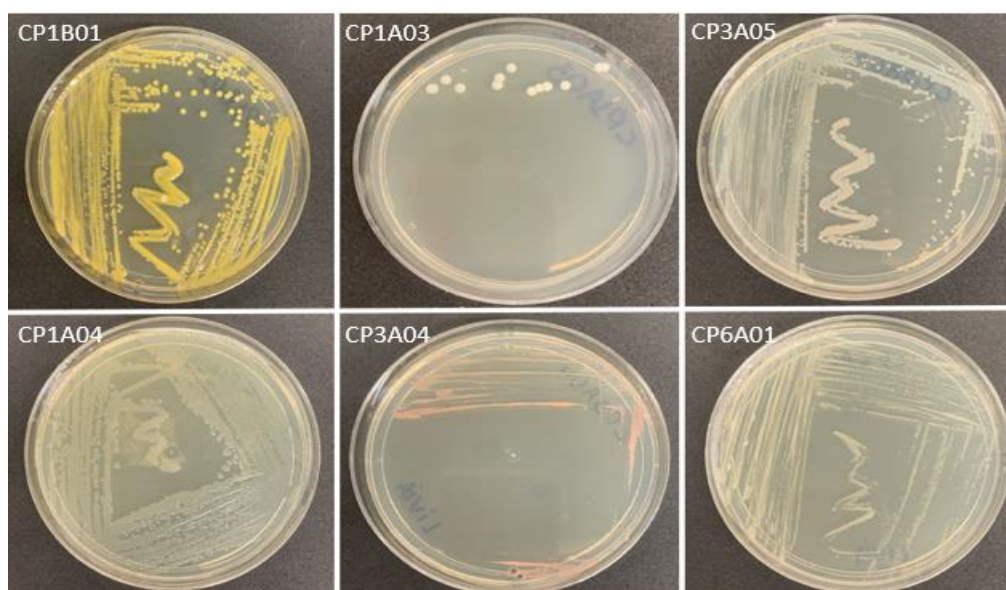
Da mesma forma, Xia e colaboradores (2023) observaram em seu trabalho com pastagem alpina (*Leymus secalinus*) que o número de endófitos foi variável em diferentes tecidos. Os valores encontrados nas amostras de raízes foram significativamente maiores que os dos caules e das folhas.

### **3.2 Caracterização morfológica macroscópica e microscópica dos isolados**

Conforme descrito e detalhado na tabela 3.2, as colônias isoladas apresentaram tamanhos distintos que variaram desde puntiformes a grandes. Quanto as formas elas caracterizaram-se como irregulares ou circulares de margens inteiras ou onduladas. As colorações variaram em branco, rosa, amarelo e não pigmentado, sendo algumas com brilho e outras sem. Encontraram-se também texturas lisas e rugosas de consistência suave ou mucoide. Além disso, foram observadas colônias transparentes e opacas de elevação plana, convexa e umbilicada (Figura 3.1).

**Tabela 3.2** Características macroscópicas das colônias isoladas

<b>Cepa</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Forma</b>	<b>Margem</b>	<b>Transparência</b>	<b>Brilho</b>	<b>Cor</b>	<b>Textura</b>	<b>Elevação</b>	<b>Consistência</b>
CP1B01	Médio	Circular	Inteira	Opaca	Com brilho	Amarelo	Lisa	Convexa	Suave
CP1A02	Puntiforme	Circular	Inteira	Transparência	Com brilho	Amarelo	Lisa	Convexa	Suave
CP1A03	Grande	Circular	Inteira	Opaca	Com brilho	Branco	Lisa	Umbilicada	Suave
CP1A04	Pequeno	Irregular	Ondulada	Transparente	Com brilho	Não pigmentada	Lisa	Plana	Suave
CP2A01	Puntiforme	Circular	Inteira	Opaca	Com brilho	Não pigmentada	Lisa	Convexa	Suave
CP3A01	Pequeno	Circular	Inteira	Transparente	Com brilho	Amarelo	Lisa	Convexa	Mucoide
CP3A02	Puntiforme	Circular	Inteira	Opaca	Com brilho	Amarelo	Lisa	Convexa	Suave
CP3A03	Pequeno	Circular	Inteira	Opaca	Com brilho	Não pigmentado	Lisa	Plana	Suave
CP3A04	Médio	Irregular	Ondulada	Opaca	Sem brilho	Rosa	Rugosa	Umbilicada	Suave
CP3A05	Puntiforme	Circular	Inteira	Transparente	Com brilho	Não pigmentado	Lisa	Plana	Suave
CP5A01	Grande	Circular	Inteira	Opaca	Com brilho	Rosa	Lisa	Plana	Suave
CP6A01	Médio	Irregular	Ondulada	Transparente	Sem brilho	Não pigmentado	Lisa	Umbilicada	Mucoide
CP6A02	Puntiforme	Circular	Inteira	Opaca	Com brilho	Rosa	Lisa	Convexa	Suave



**Figura 3.1** Características macroscópicas das diferentes colônias isoladas semeadas em placas com meio de cultura ISP2 (Próprio autor).

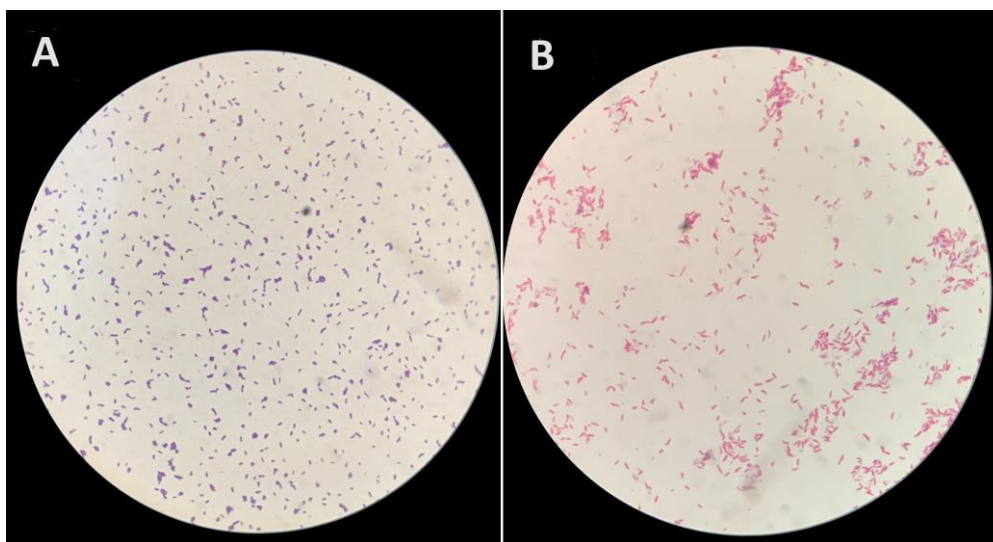
Características semelhantes as deste estudo foram encontradas por Delbari e colaboradores (2023), os quais isolaram actinobactérias endofíticas de três plantas medicinais (*Thymes kotschyanus*, *Allium hooshidaryae*, *Cerasus microcarpa*). Em meio ISP-2, as cepas isoladas apresentaram-se com formatos circulares e irregulares nas cores branca, amarelo alaranjado e amarelo claro; com presença e ausência de brilho.

Segundo o trabalho de Ali e colaboradores (2022), realizado com actinobactérias endofíticas de *Citrullus colocynthis* (L.), as características morfológicas macroscópicas isoladas em meio ISP-2 foram circulares e brilhantes de coloração branco, rosa ou acastanhada; sendo estas características identificadas nas cepas isoladas.

Outrossim, das 19 colônias obtidas, foram identificados 15 isolados com características macroscópicas diferentes entre si. Entretanto, apenas 11 foram submetidos a coloração de Gram, pois 4 cepas foram perdidas no processo de replicação e purificação das colônias.

Em relação a análise microscópica das colônias bacterianas, realizada através de microscopia óptica (aumento de 1000x), foram evidenciadas a presença de bacilos em todos os isolados. A variação da micromorfologia restringiu-se a afinidade tintorial (Figura 3.2), pois 5/11 isolados apresentaram-se como Gram-positivos (Tabela 3.3).

Segundo a literatura, a maioria das bactérias endófitas são Gram-positivo e correspondem aos filos de Firmicutes e Actinobacteria (ROBINSON et al., 2015; GODINHO; BHOSLE, 2013).



**Figura 3.2** Características microscópicas dos isolados. Foram encontradas morfologias de bacilos gram-positivo (A) e bacilos gram-negativo (B) (Próprio autor).

**Tabela 3.3** Características microscópicas dos isolados a partir do método de Gram

Cepa	Afinidade tintorial	Morfologia
CP1B01	Gram-positivo	Bacilos
CP1A02	Gram-positivo	Bacilos
CP1A04	Gram-negativo	Bacilos
CP2A01	Gram-positivo	Bacilos
CP3A01	Gram-positivo	Bacilos
CP3A02	Gram-negativo	Bacilos
CP3A04	Gram-negativo	Bacilos
CP3A05	Gram-negativo	Bacilos
CP5A01	Gram-negativo	Bacilos
CP6A01	Gram-positivo	Bacilos
CP6A02	Gram-negativo	Bacilos

No trabalho de Tallei e colaboradores (2020), encontraram-se características similares a do presente estudo em 2 bactérias endofíticas isoladas de folhas de *Ficus minahassae*, sendo o isolado Gram-positivo identificado como uma Actinobacteria e o Gram-negativo com uma Proteobacteria.

Em contrapartida, em um estudo acerca do isolamento de bactérias endofíticas de plantas de cebolas, desenvolvido por Murtado e colaboradores (2020), foram encontradas apenas cepas Gram-negativas entre os microrganismos isolados.

Resultados parcialmente semelhantes ao desse estudo foram encontrados em um trabalho de isolamento de bactérias endofíticas em plantações de banana. A partir do método de Gram, foram visualizadas morfologias de bacilos e cocos. Quanto a coloração, a maioria deles foi considerada como Gram-positivo (ARAÚJO, 2020).

### 3.3 Identificação das actinobactérias

#### 3.3.1 Testes bioquímicos

Dos isolados Gram-positivos, fenótipo do grupo das actinobactérias, foram observadas as seguintes características bioquímicas, descritas na tabela 3.3. Destas, o isolado CP6A01 apresentou resultados distintos as demais cepas, tais como a utilização de citrato como fonte de carbono e fermentação de glicose, sacarose e lactose. Não obstante, foi observado a variação nos diferentes isolados quanto a produção de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 3.3** Provas bioquímicas realizadas nas cepas Gram-positivas

Cepa	Catalase	Citrato	Fenilalanina	Fermentação	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S
CP1B01	Positivo	Negativo	Negativo	Glicose	Positivo	Negativo
CP1A02	Positivo	Negativo	Negativo	Glicose	Positivo	Negativo
CP3A01	Positivo	Negativo	Negativo	Glicose	Negativo	Negativo
CP3A02	Positivo	Negativo	Negativo	Glicose	Negativo	Negativo
CP6A01	Positivo	Positivo	Negativo	Glic. /Sac./Lac.	Positivo	Negativo

Da mesma forma, foram realizadas provas bioquímicas com as cepas Gram-negativas, as quais estão detalhadas no anexo A. Porém, com as características anteriormente descritas dos diferentes isolados não foi possível a realização da identificação deles como actinobactérias.

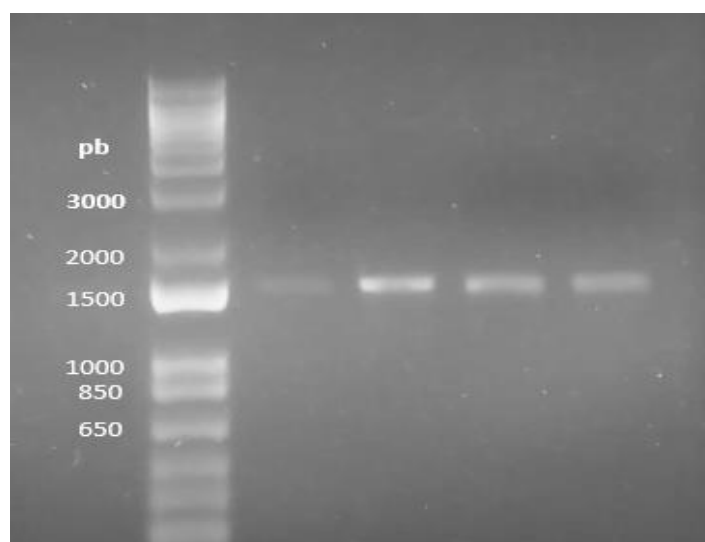
Nesse estudo, todos os isolados Gram-positivos apresentaram catalase positivo, fenilalanina negativo e H<sub>2</sub>S não produzido. Análises similares a esta foram encontrados por Krishnamurthi e colaboradores (2012), os quais isolaram uma cepa de actinobactéria do solo de superfície.

As variações dos resultados deste estudo quanto a caracterização bioquímica concentraram-se na capacidade de utilizar citrato como única fonte de carbono, fermentação de carboidratos e produção de CO<sub>2</sub>. Godinho e Bhosle (2013), em seu trabalho com uma actinobactéria de rizosfera, encontraram características como citrato positivo e fermentação de glicose, sendo este perfil identificado na cepa isolada CP6A01.

No estudo de Betancur e colaboradores (2017), desenvolvido com actinobactérias marinhas, o perfil bioquímico da maioria das cepas apresentaram: presença da enzima catalase, ausência da produção de H<sub>2</sub>S e fermentação de glicose. Esses reportes assemelham-se com os achados desse trabalho.

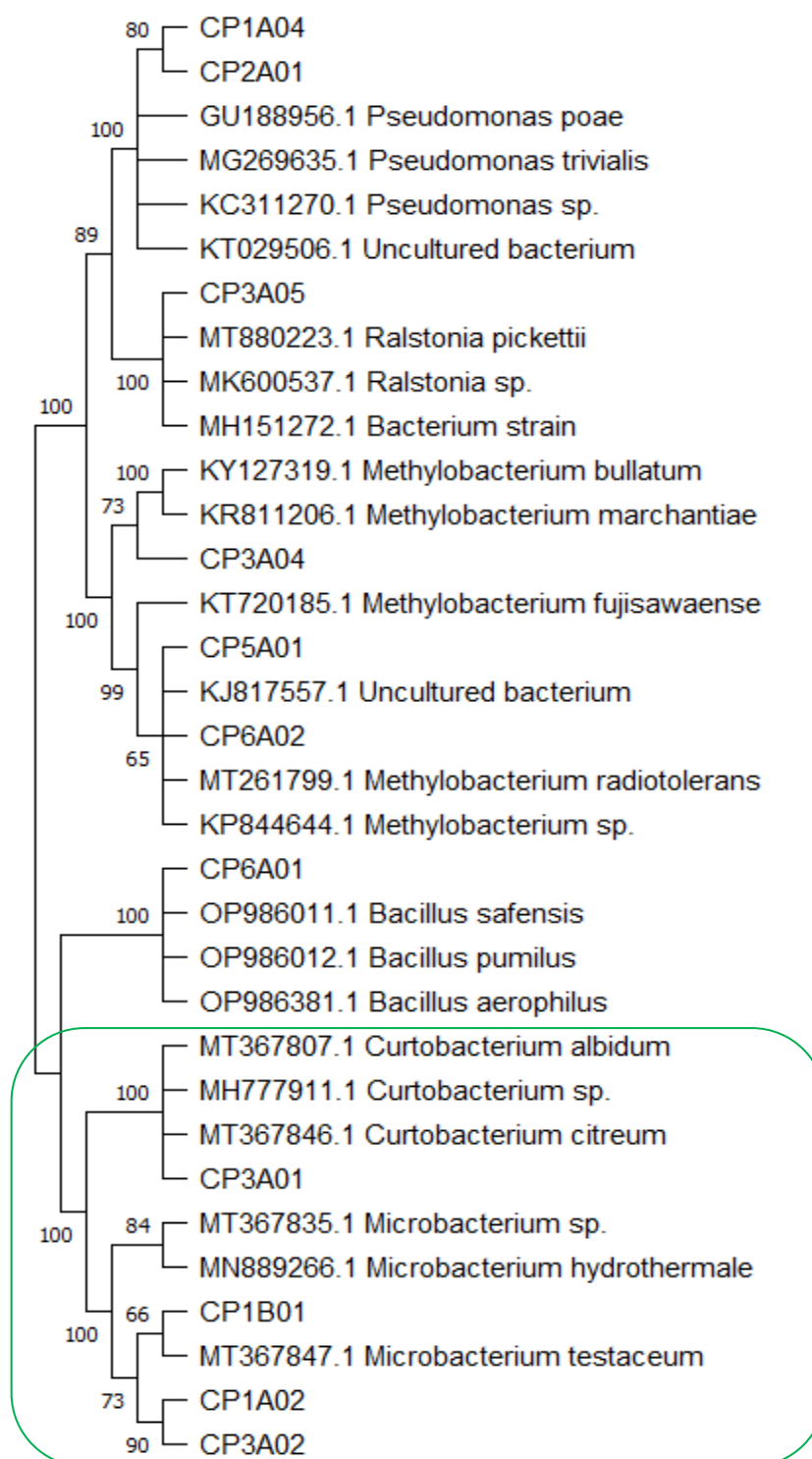
### 3.4 Caracterização molecular

Após a extração, foi observado que a concentração de DNA variou entre 19,7 a 127,1 ng/μl e o grau de pureza entre 1,56 a 1,84. Foi amplificado o segmento 16S rRNA obtendo-se um produto de até 1500 pb (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Marcador de peso molecular e fragmentos de DNA amplificados separados por eletroforese em gel de agarose, mostrando a obtenção de produtos de até 1500 pb (Próprio autor).

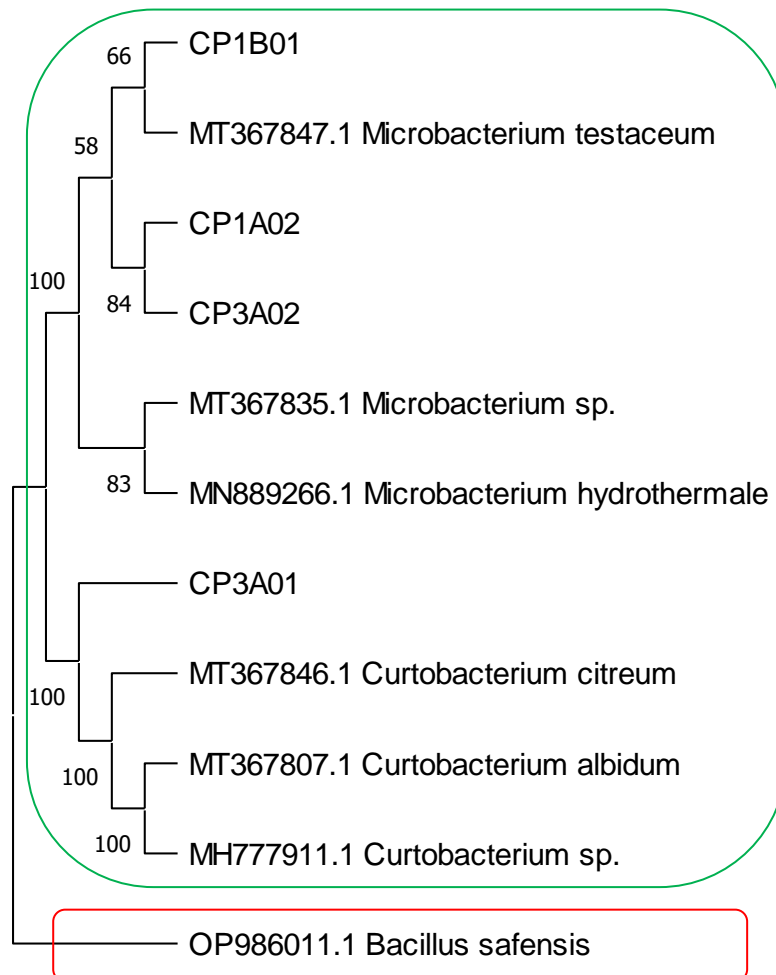
A análise de sequenciamento do marcador 16S rRNA dos diferentes isolados apresentaram 99% de similaridade com os seguintes gêneros: *Microbacterium* (3 cepas), *Curtobacterium* (1 cepa), *Pseudomonas* (2 cepas), *Ralstonia* (1 cepa), *Methylobacterium* (3 cepas) e *Bacillus* (1 cepa) (Figura 3.3).



**Figura 3.4** Árvore filogenética das sequências de 16S rRNA de todos os isolados e da base de dados do NCBI. Na marcação em cor verde está agrupado o filo das actinobactérias. A análise filogenética foi realizada a partir do método *Maximum Likelihood* utilizando o software MEGA versão 11 com o modelo de substituição de Tamura 3. O número de nós indica o nível de suporte de *bootstrap* (%) baseado em 1000 réplicas do banco de dados (Próprio autor).



Os gêneros *Microbacterium* e *Curtobacterium* agrupam-se no filo das actinobactérias (*ingroup*) (Figura 3.5). Os demais isolados correspondem a bactérias não pertencentes ao grupo em estudo (*outgroup*).



**Figura 3.5** Árvore filogenética das sequências de 16S rRNA dos isolados caracterizados como actinobactérias e uma cepa não pertencente a esse grupo. Na marcação em cor verde está agrupado o filo das actinobactérias (*ingroup*) e na marcação em vermelho está destacado um representante fora do grupo das actinobactérias (*outgroup*). A análise filogenética foi realizada a partir do método *Neighbor-Joining* utilizando o software MEGA versão 11 com o modelo de substituição de Kimura 2. O número de nós indica o nível de suporte de *bootstrap* (%) baseado em 1000 réplicas do banco de dados (Próprio autor).

O 16S rRNA é o marcador molecular simples mais utilizado para a classificação de procariontes, entretanto, o sequenciamento desta molécula não pode diferenciar de forma confiável algumas espécies bacterianas que estão estreitamente relacionadas. Então, é necessário a combinação de outros genes essenciais para essas

diferenciações (VERA LOOR et al., 2021). Como foi observado neste trabalho as diferentes cepas isoladas foram classificadas ao nível de gênero.

Apesar de que a recuperação de bactérias endofíticas é maior nas raízes do que em caules e folhas, no presente estudo foram identificados diferentes gêneros bacterianos que foram reportadas em outros trabalhos, tais como *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* e *Pantoea* (SIPRIYAD et al., 2022; HOU et al., 2013; GODINHO; BHOSLE, 2013; OUYANG et al., 2023).

Análises filogenéticas agruparam a maioria das actinobacterias em clados distintos de gêneros conhecidos dentro de Micromonosporaceae, assim como foi reportado por Janso e Carter (2010). Os isolados foram bactérias Gram-positivo, não formadoras de esporos e pertencentes aos gêneros *Curtobacterium* e *Microbacterium*. Este apresentou colônias amarelo pálido, lisas, convexas e redondas com margens inteiras, assim como foi descrito em trabalhos anteriores (AIZAWA, et al., 2007; GODINHO; BHOSLE, 2013). Quanto a processos metabólicos, elas apresentam características de solubilidade em KOH a 3 % e catalase positiva (UESUGI; FREITAS; MENEZES, 2003), sendo estas características identificadas nas cepas isoladas.

Por outro lado, alguns dos demais gêneros isolados são microrganismos patogênicos e outros estão em simbiose com a planta hospedeira, desenvolvendo funções de biocontrole, como no caso de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Curtobacterium* (MEDISON et al., 2022). O gênero *Bacillus*, por exemplo, apresenta atividade antifúngica para o patógeno *P. palmivora* que afeta os plantios de cacau (ZUBIR et al., 2019).

Ademias, foram identificadas neste trabalho o gênero *Methylobacterium*, que é composto principalmente por bactérias metilotróficas facultativas de pigmentação rosa e é usualmente um importante endófito na cana-de-açúcar. Esse gênero desempenha um papel importante no crescimento e rendimento de culturas, pois são responsáveis pelo aumento da germinação de sementes, área foliar, altura da planta e número de internódios (ZHANG et al., 2021).

Um outro achado deste estudo foi o isolamento de gênero *Ralstonia* que, além de produzir biomoléculas de interesse, é amplamente utilizado no processo de

biorremediação, assim como o gênero *Microbacterium* (CRUZ-HERNÁNDEZ et al., 2020).

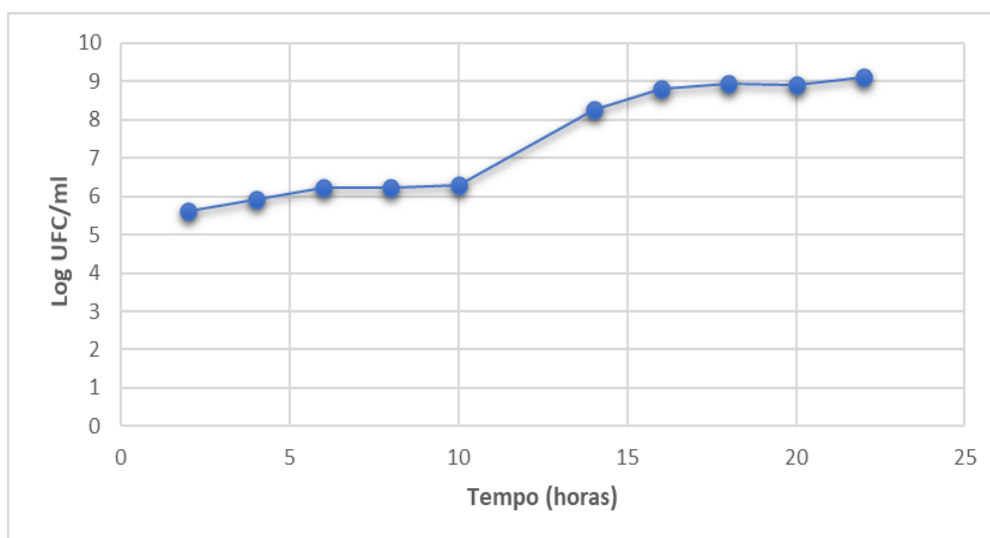
Em um trabalho desenvolvido por Wang e colaboradores (2022), as bactérias endofíticas isoladas de *Dendrobium* (orquídeas) foram classificadas em 3 filos diferentes (Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria). Na diversidade de gêneros foram identificados *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Kosakonia*, *Paracoccus* e *Staphylococcus*; alguns dos achados do presente estudo.

Os microrganismos endofíticos apresentam amplo potencial biotecnológico, principalmente na produção de biomoléculas com diversas aplicabilidades. Sobretudo, as actinobactérias destacam-se na produção de metabólitos secundários com capacidade antimicrobiana e, por isso, são buscadas nos mais variados nichos ecológicos (SELIM; ABDELHAMID; MOHAMED, 2021).

### 3.5 Cinética de crescimento

No presente estudo, foi escolhido aleatoriamente um representante de cada gênero isolado pertencente ao filo das actinobactérias. Tal escolha visou a realização e análise da cinética de crescimento bacteriano. Esta metodologia foi empregada a fim de visualizar a fase estacionária de crescimento ou fase platô, onde ocorre a produção dos metabólitos secundários que podem desempenhar atividade antimicrobiana (KUMAR et al., 2021).

A figura 3.6 representa a cinética de crescimento da cepa CP3A01, caracterizada como *Curtobacterium*. O ponto 0 indica o momento em que foi realizado o inóculo no meio de cultura. É possível verificar que a fase de latência, onde ocorre a adaptação dos microrganismos a um novo meio e não há crescimento significativo (LIMA, 2016), ocorreu até a 10ª hora. A partir das 10 horas o referido isolado ingressou na fase exponencial ou de aumento logarítmico de crescimento. Essa fase possuiu aproximadamente 5 horas de duração, sendo finalizada em torno das 16 horas, com o tempo de duplicação de 0,90 hora. Já a fase estacionária é iniciada logo em seguida, entre a 16ª e 17ª hora.



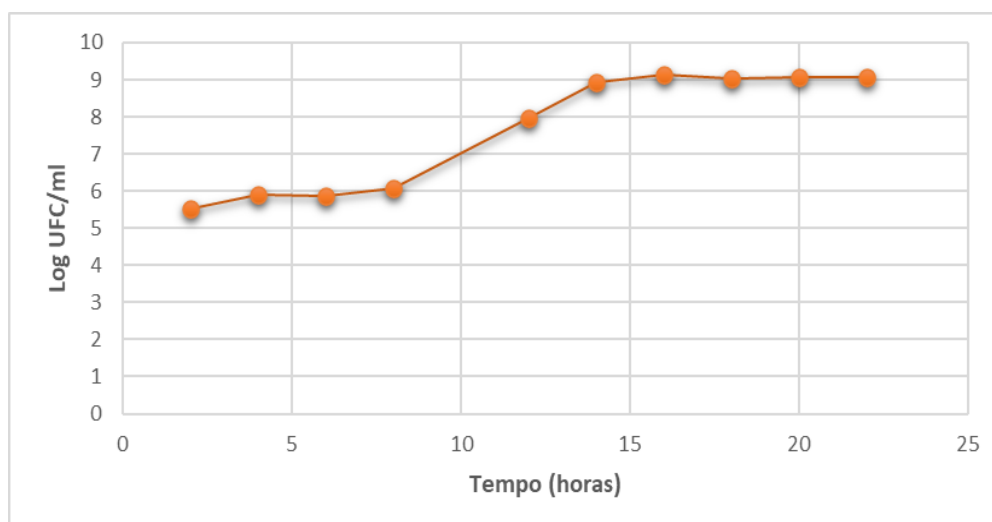
**Figura 3.6** Cinética de crescimento da cepa CP3A01 (*Curtobacterium*) (Próprio autor).

Análises referente a cinética de crescimento de *Curtobacterium* mostraram que a fase estacionária encontra-se a partir das 16 horas, assim como foi reportado por Almajali e colaboradores (2021). Em contrapartida, Khaled e colaboradores (2022) encontraram como ponto inicial da fase exponencial de *Curtobacterium flaccumfaciens* as 20 horas após a inoculação.

No trabalho de Mistry, Patel e Bhavshar (2009), realizado com *Curtobacterium pusillum*, para o estudo da absorção de cromo e a relação dela com essa espécie, foi verificado o começo da fase exponencial às 24 horas na análise de crescimento com ausência de cromo.

Com base na ilustração também foi possível notar que na fase estacionária ocorreu um ponto de inflexão. Uma hipótese para este pequeno aumento no número de bacteriano é a ocorrência de uma relação ecológica de canibalismo, em que para sobreviver a condições adversas como a falta de nutrientes, um organismo alimenta-se de outros da mesma espécie. Nesse contexto, as bactérias vivas estão consumindo as bactérias mortas e a partir desse substrato elas estão conseguindo novamente se recuperar e aumentar seu número de UFC (POPP; MASCHER, 2019).

Da mesma forma, a cepa CP3A02 (*Microbacterium*) foi submetida a análise da curva de crescimento (Figura 3.7). Verificou-se que a fase de latência obteve uma durabilidade de 8 horas. Já o início da fase exponencial ocorreu às 9 horas, com duração de 5 horas, sendo finalizada por volta das 16 horas, com o tempo de duplicação de 0,78 hora. Já a fase estacionária foi alcançada após as 16 horas.



**Figura 3.7** Cinética de crescimento da cepa CP3A02 (*Microbacterium*) (Próprio autor).

Existem poucos achados na literatura acerca do comportamento de crescimento do gênero *Microbacterium* (AGHAEI et al., 2020; SOLYANIKOVA et al., 2015). No entanto, Li e colaboradores elaboraram um estudo com *Microbacterium oxydans* a fim de pesquisar a relação desta cepa na degradação de fenol e obtiveram como resultado o início do estágio platô às 30 horas.

Ademais, no trabalho de Cregut e colaboradores (2012), realizado com uma cepa de *Microbacterium* isolada do solo, encontraram-se semelhantes valores a deste estudo quanto a observação da fase estacionária desse gênero.

Em suma, as curvas mensuradas atenderam de forma adequada ao objetivo deste trabalho, uma vez que demonstraram o início da fase platô ou estacionária e serviram de subsídio para a realização da avaliação do potencial das actinobactérias isoladas

### 3.6 Avaliação do potencial antimicrobiano das actinobactérias

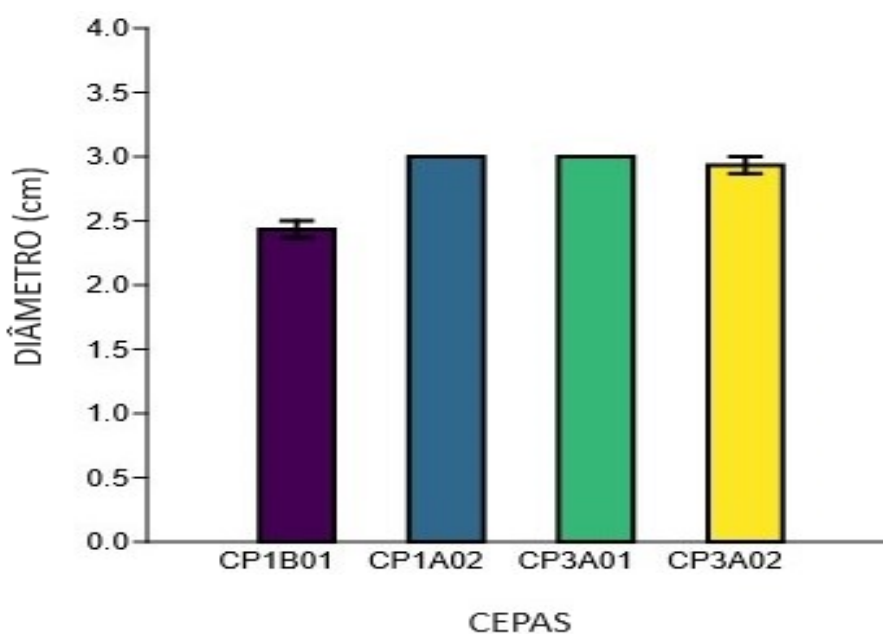
Após ser encontrado o tempo de produção dos metabólitos secundários, foi efetuado a avaliação da atividade antimicrobiana das actinobactérias isoladas, onde foi visualizada a formação de halos de inibição de todas as cepas (CP1B01, CP1A02, CP3A01 E CP3A02) no teste com *S. aureus* (Figura 3.8), podendo ser verificada a atividade antimicrobiana dessas 4 cepas contra *S. aureus*. No entanto, nos testes realizados contra a bactéria *E. coli* não foi observado a formação do halo de inibição,

ou seja, as cepas em estudo não apresentaram compostos antimicrobianos capazes de inibir o crescimento dessa bactéria.



**Figura 3.8** Formação do halo de inibição da cepa CP3A01 frente a *S. aureus* (Próprio autor).

Foram encontrados valores que variaram de 2,3 cm a 3 cm na medição dos diâmetros dos halos de inibição formado pelas actinobactérias isoladas frente a bactéria *S. aureus* (Figura 3.9). Foi verificado uma diferença significativa (Kruskal-Wallis;  $\chi^2 = 6,577$ ;  $p$  value= 0,02489) entre as cepas com capacidade antimicrobiana.



**Figura 3.9** Medição do diâmetro dos halos de inibição, em centímetros, formado pelas actinobactérias isoladas frente a *S. aureus* no teste de difusão em ágar (Próprio autor).

Um achado semelhante mostrou que uma actinobactéria, isolada de *Ficus minahassae*, inibiu o crescimento de *S. aureus*, mas não de *E. coli*. (TALLEI et al., 2020). Em um outro estudo de Kumar e Rao (2012), onde foram isoladas 51 actinobactérias marinhas, apenas uma exibiu atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, sendo este multirresistente.

Outrossim, no trabalho de Delbari e colaboradores (2023), 9 cepas de actinobactérias foram isoladas de plantas medicinais; destas, duas cepas inibiram o crescimento de *E. coli* e 4 de *S. aureus*. Já Majidzadeh, Heidarieh e Vakili (2021), em sua pesquisa com 18 actinobactérias obtidas de solo, encontraram 3 isolados com potencial antimicrobiano contra *S. aureus* e 3 isolados contra *E. coli*.

Os resultados deste trabalho evidenciaram que as 4 actinobactérias isoladas apresentaram potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus auerus*. Tais resultados possuem grande relevância, pois, de acordo com a OMS, várias bactérias Gram-positivo são resistentes aos tratamentos atuais e requerem o desenvolvimento de novos antibióticos para combater a resistência (JUBEH et al., 2020).

## Capítulo 4 – Conclusões

No presente trabalho foi possível realizar o isolamento de 11 cepas bacterianas endófitas coletadas de folhas e fragmentos de caule de cacueiros (*Theobroma cacao*), sendo o maior número destas procedentes das plantas expostas ao sol.

A caracterização morfológica, tanto macroscópica como microscópica, dos isolados foi variada e a análise das características bioquímicas não foi suficiente para a identificação de actinobactérias.

No caso da análise de sequenciamento com o marcador 16S rRNA, foi possível identificar todas as cepas a nível de gênero. Destas, 4 foram identificadas como actinobactérias, sendo 3 pertencentes ao gênero *Microbacterium* e uma ao *Curtobacterium*. Os outros isolados foram caracterizados como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Ralstonia* e *Methilobacterium*.

As 4 cepas do filo Actinobacteria foram submetidas ao teste de avaliação da atividade antimicrobiana. Todas elas inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, demonstrando serem eficazes contra essa bactéria Gram-Positiva. Contudo, elas não apresentaram atividade contra *Escherichia coli*.

As perspectivas desse estudo estão centradas em, futuramente, extrair e caracterizar quimicamente os metabólitos secundários, além de poder estudar os genes de resistência presentes nessas cepas.



## Referências

AIZAWA, T. et al. *Curtobacterium ammoniigenes* sp. nov., an ammonia-producing bacterium isolated from plants inhabiting acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, UK, v. 57, jul. 2007, p. 1447–1452. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64731-0>>. Acesso em: 03 jan. 2023.

AFZAL, I. et al. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological Research**, v. 221, n. 1, abr. 2019, p. 36–49. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

ALEGRÍA, A. M. G. et al. Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: methodological validation using standard reference material and sprague dawley rat and human DNA. **International Journal of Analytical Chemistry**, London, UK, v. 2020, jul./nov. 2020, p. 1-9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2020/8896738>>. Acesso em: 20 set. 2022.

ALI, A. R. et al. Isolation and identification of endophytic actinobacteria from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad and their antibacterial **Properties**. **Microbial Cell Factories**, California, USA, v. 21, jun./out. 2022, p. 1 -17. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01936-9>>. Acesso em: 03 jan. 2023.

ALSULTAN, W. et al. Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria antagonistic to *Phytophthora palmivora* causing black pod of cocoa in Malaysia. **European Journal Plant Pathology**, California, USA, v. 155, ago./set. 2019, p. 1077–1091. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10658-019-01834-8>>. Acesso em: 09 nov. 2022.

ALVES, H. de O. **Caracterização integral do gene 16S rRNA de bactérias não esporulantes e sua ação contra *Anticarsia gemmatilis***. 2021. 54 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2021.

ALMAJALI, I. S. et al. Biodegradation of Phenol by *Curtobacterium flaccumfaciens*: optimization of growth conditions. **Pol. J. Environ. Stud.** Murtah, JOR, v. 30, n. 6, jan./abr. 2021, p. 5435-5442. Disponível em: <<https://doi.org/10.15244/pjoes/136037>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

AMARAL, S. S. et al. Potencial da atividade biológica de actinomicetos contra o fungo *Cryptococcus gattii*. **Revista Interfaces Científicas**, Aracajú, SER, v. 8, n. 2, mar. 2020, p.

95-104. Disponível em: <<https://doi.org/10.17564/2316-3798.2020v8n2p95-104>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

AMORIM, A. O.; ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. Controle de patógenos do cacauero (*Theobroma cacao* L.) por fungos endofíticos dos gêneros *Trichoderma* e *Clonostachys*. **Revista Uningá**, Maringá, PR, v. 34, n. 1, jan./mar. 2019, p.1-10. Disponível em: <<https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/3139/2098>>. Acesso em: 15 out. 2022.

ANDRADE, G. V. S. **Diversidade e bioprospecção de bactérias endofíticas associadas à *Cattleya walkeriana* e promoção do crescimento durante aclimação**. 2020. 51f, Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, 2020.

ARAÚJO, R. C. **Promoção de crescimento por bactérias endofíticas em mudas de *Musa spp.*** 2020. 51f, Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, 2020.

ARUMUGAM, T. et al. Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. **Elsevier**, India, IN, v. 107, dez. 2016/ mar. 2017, p. 225-233. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.035>>. Acesso em: 17 set. 2022.

BARBOSA, L. C.; SOUSA, C.P. Bioprospecção da atividade antimicrobiana do caldo de fermentação produzido pelo endofítico *Paenibacillus terraе* em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*. **Tecnologias avançadas e suas abordagens**, São José dos Pinhais, SP, v. 1, n. 1, jun. 2023, p. 1-15. Disponível em: <<https://doi.org/0.56238/tecavanaborda-030>>. Acesso em: 13 ago. 2023.

BARKA, E. A. et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Reims, FRA, v. 80, n. 1, nov. 2016, p. 1-43. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>>. Acesso em: 25 ago. 2022.

BARRETTI, P. B. et al. Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 33, abr. 2007/ jun. 2008, p. 2038-2044. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413-70542009000700057>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

BELI, C. M; MAGESTE, J. M; TAKETANI, N. F. Bioprospecção de enzimas para cosmética: seu impacto na biotecnologia. **Revista Ensaios Pioneiros**. São Francisco, SP, v. 3, n. 2, mar. 2020, p. 10-24, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.24933/rep.v3i2.199>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **The journal of antibiotics**. Budapest, HUN, v. 65, jan./abr. 2012, p. 385–395. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

BERLINK, R. G. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Revista Ciência e Cultura**, Campinas, SP, v. 64, n. 3, 2012, jan./mar., p.27-30. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000300010>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

BESSA, M. S. C. et al. Agricultura Familiar: Pesquisa, Formação e Desenvolvimento. **Revista Agricultura Familiar**. Belém, PA, v. 13, n. 1, 2019, jan./jun., p. 10-27. Disponível em: <<https://agritrop.cirad.fr/596542/>>. Acesso em: 10 dez. 2022.

BETANCUR, L. A. et al. Marine Actinobacteria as a source of compounds for phytopathogen control: An integrative metabolic-profiling / bioactivity and taxonomical approach. **Plos one**, Paris, FR, v 12, n. 2, set./dez 2017, p. 1-25. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170148>>. Acesso em: 8 jun. 2023.

BOGAS, A. C. et al. Endophytic microorganisms from the tropics as biofactories for the synthesis of metal-based nanoparticles: healthcare applications. **Front. Nanotechnol., Sec. Biomedical Nanotechnology**, São Carlos, SP, v. 4, n. 1 jan./fev. 2022, p. 1-13 Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fnano.2022.823236>>. Acesso em: 24 fev. 2023.

BORAZZO, J. B.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Prospecção biotecnológica de bactérias endofíticas associadas à cactáceas. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, Maringá, PR, v. 12, n. 2, fev. 2021, p. 567-579. Disponível em: <<https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.002.0049>>. Acesso em: 04 nov. 2022.

BRAGA, D. P. P; DOMENE, F; GANDARA, F. B. Shade trees composition and diversity in cacao agroforestry systems of southern Pará, Brazilian Amazon. **Springer**, New York, USA, v. 93, n. 1, p. 1409–1421 (2019). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10457-018-0250-6>>. Acesso em: 29 ago. 2022.

BRAINER, M. S. C. P. Produção de cacau. **Caderno setorial ETENE** (Escritório Técnico De Estudos Econômicos Do Nordeste). Fortaleza, CE, Ano 6, n. 149, jan. 2021, p. 1-23.

Disponível em: <[https://g20mais20.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/650/3/2021\\_CDS\\_149.pdf](https://g20mais20.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/650/3/2021_CDS_149.pdf)>. Acesso em: 20 dez. 2022.

BRATBAK, G.; DUNAS, I. Bacterial Dry Matter Content and Biomass Estimations. *Applied and environmental microbiology*, Bergen, NOR, v. 48, n. 4, fev./ jun. 1984, p. 755-757. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.48.4.755-757.1984>>. Acesso em: 20 set. 2022.

BRANCO, F. et al. Actinobactérias isoladas de solo amazônico: uma promissora fonte de enzimas de aplicação industrial. **Diversidade Microbiana da Amazônia**, Jandaia, GO, v. 3, n. 1, mai./jun. 2019, p. 218-223. Disponível em: <[https://doi.org/10.18677/EnciBio\\_2022B2](https://doi.org/10.18677/EnciBio_2022B2)>. Acesso em: 15 fev. 2020.

BREWSTER, J. D. A simple micro-growth assay for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, n. 1, abr. 2003, p. 77–86. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00226-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00226-9)>. Acesso em: 25 fev. 2023.

BRITO, G. B.; TREVISAN, M. O uso indevido de antibióticos e o eminente risco de resistência bacteriana. **Revista Artigos.Com**, São Paulo, SP, v. 30, n. 1, jul. 2021, p. 1-9. Disponível em: <<https://acervomais.com.br/index.php/artigos/article/view/7902>>. Acesso em: 22 nov. 2021.

BUTLER, M. S.; PETERSON, D. L. Antibiotics in the clinical pipeline in October 2019. **The Journal of Antibiotics**, Brisbane, AUS, v. 73, n. 1 jan./mar. 2020, p. 329-364. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41429-020-0291-8>>. Acesso em: 20 nov. 2021.

CONTRUCCI, B. A. et al. Efeitos de óleos essenciais sobre bactérias gram-negativas isoladas de alimentos. **Ensaios e Ciências**, São Paulo, SP, dez. 2019, v. 23, n. 3, p. 180-184. Disponível em: <<https://doi.org/10.17921/1415-6938.2019v23n3p180-184>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

COSTA, A. L. P.; SILVA JÚNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, AP, v. 7, n. 2, maio/ago. 2017, p. 45-57. Disponível em: <<https://doi.org/10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57>>. Acesso em: 20 nov. 2021.

CREGUT, M. et al. Compartmentalization and regulation of arylsulfatase activities in *Streptomyces* sp., *Microbacterium* sp. and *Rhodococcus* sp. soil isolates in response to inorganic sulfate limitation, Paris, FR, v. 168, n. 1, abr./ago. 2012, p. 12-21. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.08.001>>. Acesso em: 10 set. 2022.

CRUZ F. P. N. et al. 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**, São Carlos, SP, v. 2021, n. 1, jan./fev. 2021, p. 1-17, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2021/6618559>>. Acesso em: 20 nov. 2021.

CRUZ-HERNANDEZ, M. A. et al. Characterization of a microbacterium sp. strain isolated from soils contaminated with hydrocarbons in the burgos basin, Mexico. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, Tamaulipas, MEX, v. 37, n. 1, ago. 2020/mar, p. 227-235. 2021 Disponível em: <<https://doi.org/0.20937/RICA.53837>>. Acesso em: 15 nov. 2022.

DELBARI, Y. et al. Identification and anti-bacterial property of endophytic actinobacteria from Thymes kotschyanus, Allium hooshidaryae, and Cerasus microcarpa. Kermanshah, IRA. v. 13, n. 1, p. 1-14. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-023-40478-x>> Acesso em: 15 set. 2023

DARRIBA, D. et al. ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. **BioRXD**, v. 1, n. 1, abr. 2019, p. 1-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/612903>>. Acesso em: 10 set. 2022.

DEY, M.; SINGH, D. A New Species of Cololejeunea (*Hepaticae: Lejeuneaceae*) from Eastern Himalaya, India. **Taiwania**, IND, v. 53, n. 3, fev./mai. 2008, p. 258-263. Disponível em: <[https://doi.org/10.6165/tai.2008.53\(3\).258](https://doi.org/10.6165/tai.2008.53(3).258)>. Acesso em: 10 set. 2022.

DHABAAN, F. A. E. Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. **Science direct**, Dharan, SAU, v. 26, n. 6, set. 2019, p. 1247-1252. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.029>>. Acesso em: 10 set. 2022.

DUARTE, S. M. S. et al. Revisão sistemática da resistência e farmacodinâmica de antibióticos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, PR, v. 5, n. 10, jan./out. 2019, p. 21476 – 21489. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv5n10-301>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

FITRI, L. et al. Isolation and characterization of soil actinobacteria as cellulolytic enzyme producer from Aceh Besar, Indonesia. **Biodiversitas**, Aceh, IDN, v. 22, n. 11, set./nov. 2021, p. 5169-5180. Disponível em: <<https://doi.org/10.13057/biodiv/d221155>>. Acesso em: 17 nov. 2022.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmagnosia**, Maringá, RJ, v. 18, n. 4, out./dez. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400022>>. Acesso em: 05 dez. 2022.

GIULIATTI, N. M., et al. Variabilidade da precipitação mensal e anual no município de Paragominas-PA. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, GO, v. 16, n. 29, abr./jun. 2019, p. 1716-1730. Disponível em: <[https://doi.org/10.18677/EnciBio\\_2019A133](https://doi.org/10.18677/EnciBio_2019A133)>. Acesso em: 12 dez. 2022.

GOLINSKA, P. et al. Actinobactérias endofíticas de plantas medicinais: diversidade e bioatividade. **Antonie van Leeuwenhoek**. Torun, Poland, v. 108, n. 1, abr./jun. 2015, p. 267-289. Disponível em: <[https://doi.org/10.18677/EnciBio\\_2022B2](https://doi.org/10.18677/EnciBio_2022B2)>. Acesso em: 20 nov. 2022.

GODINHO, A. L.; BHOSLE, S. Microbacterium arborescens AGSB sp. nov., isolated from the rhizosphere of sand dune plant, Ipomoea pes caprae. **African Journal of Microbiology Research**, Goa, IN, v. 7, n. 45, out./nov. 2013, p. 5154-5158. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJMR10.198>>. Acesso em: 5 dez. 2022.

GOMES, K. M.; DUARTE, R. S.; BASTOS, M. Lantibiotics produced by Actinobacteria and their potential applications (a review). **Microbiology**, Rio de Janeiro, RJ, v. 163, n. 2, out./nov. 2017 p. 109-121. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/mic.0.000397>>. Acesso em: 02 set. 2022.

GOODFELLOW, M. et al. **Berguey's manual of sistematic bacteriology**. New York: Springer, 2ª ed., v. 5. The Actinobacteria, Part A, 2012.

HOU, Z. et al. Incidence of naturally internalized bacteria in lettuce leaves. **International Journal of food Microbiology**, Minnessota, USA, v. 152, jan./fev. 2013, p. 260-265. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.027>>. Acesso em: 6 dez. 2022.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A. W; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Elsevier**, Amsterdam, NED, v. 51, out./nov. 2019, p. 72-80. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

IBGE. **Diretoria de Pesquisas** - DPE - Coordenação de População e Indicadores Sociais - COPIS. Estimativa da população em 2016. Disponível em: <[http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=150550&idtema=130&search=p ara |paragominas |estimativa-da-populacao-2018](http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=150550&idtema=130&search=p%20ara%20paragominas%20estimativa-da-populacao-2018)>. Acesso em: 08 set. 2022.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática**. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>. Acesso em: 15 out. 2022.

ISLAM, R. et al. Antibacterial activity of lactic acid bacteria and extraction of bacteriocin protein. **Scientific Research Publishing**, Faridpur, BGD, v. 11, jan./fev. 2020, p. 49-59. Disponível em: <<http://doi.org/10.4236/abb.2020.112004>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

JABBOROVA, D. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Ukaaz Publications**, Tashkent, Uzbekistan, v. 9, n.1, abr./jun. 2020, p. 116-121. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-023-02534-2>>. Acesso em: 15 nov. 2022.

JANSO, J. E.; CARTER, G. T. Biosynthetic Potential of Phylogenetically Unique Endophytic Actinomycetes from Tropical Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, EUA, v. 76, n. 13, dez. 2009/ mai. 2010, p. 4377–4386. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.02959-09>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

JUBEH, B. et al. Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches. **Molecules**, Jerusalem, PO, v. 25, n.12, mai./jun. 2020 p. 2888. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25122888>>. Acesso em: 14 out. 2022.

KHLEIFAT, K. et al. Biodegradation modeling of phenol using *Curtobacterium flaccumfaciens* as plant-growth-promoting bacteria. **Heliyon**, Amman, JOR, v. 8, n. 1, mar./ago. 2022, p. 1-16. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10490>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

KRISHNAMURTHI, S. et al. *Microbacterium immunditiarum* sp. nov., an actinobacterium isolated from landfill surface soil, and emended description of the genus *Microbacterium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Chandigarh, IN, v. 62, set. 2012, p. 2187–2193. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijs.0.033373-0>>. Acesso em: 27 nov. 2022.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, Philadelphia, USA, v. 35, n. 6, jun. 2018, p. 1547–1549. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

LATA, R. et al. Induction of **abiotic** stress tolerance in plants by endophytic microbes. **Journal of Applied Microbiology**, Cambridge, UK, v. 56, out. 2018, p. 268-276. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/lam.12855>>. Acesso em: 04 nov. 2022.

LARKIN H. Increasing Antimicrobial Resistance Poses Global Threat, WHO Says. **JAMA**, v. 17, n. 3, jan. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jama.2022.23552>>. Acesso em: 24 fev. 2023.

LAVANHOLE, D.F. et al. Ecofisiologia da germinação dos genótipos de Treobroma cacao L. **Iheringia**, Porto Alegre, RS, v. 74, jun. 2019, p. 1-10. Disponível em: <<https://doi.org/10.21826/2446-82312019v74e2019007>>. Acesso em: 14 out. 2022.

LAW, J. W. et al. The Rising of “Modern Actinobacteria” Era. **Progress in Microbes and Molecular Biology**. Bandar Sunway, MA, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.36877/pmmb.a0000064>>. Acesso em: 14 out. 2022.

LEE, L. H.; GOH, B. H.; CHAN, K. G. Actinobacteria: prolific producers of bioactive metabolites. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, CH, v. 11, n. 1, mai./ago. 2020, p. 1-3. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01612>>. Acesso em: 14 out. 2022.

LIMA, E. B. **Estudo da cinética de crescimento e resistência de microrganismos (Saccharomyces cerevisia e Zymomonas mobilis) na presença Cisplatina empregando um sistema de fluxo batelada**. 2016, 65f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, Aveiro, POR, v. 34, n. 1, out./nov. 2016, p. 77-84. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

MAHTABUDDIN, T. et al. Antiotic resistance in microbes: history, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Elsevier**, Amsterdam, NED, v. 14, n. 1, ago./dez. 2021, p. 1750-1766. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

MANIVASAGAN, P. et al. Marine actinobacteria: An important source of bioactive natural products. **Elsevier**, Republic of Korea, PRK, v. 38, n. 1, mar./mai 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.014>>. Acesso em: 07 nov. 2021.



MARDIAH, I. Identification of Endophytic Bacterial Isolated from Oil Palm Plants with Anti-Fungal Activity against *Ganoderma boninense*. **Pharmacology and Clinical Pharmacy Research**. Bandung, INDO, v. 3 n. 2 ago. 2018, p. 41-49 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.15416/pcpr.v3i2.20005>>. Acesso em: 07 jan. 2023.

MARTINS, S. et al. Ação antimicrobiana de actinomicetos rizosféricos de guaranazeiro. **Nature and Conservation**, Amazonas, BRA, v. 14, n. 1, dez. 2020/jan. 2021, p. 83-89, 2021. Disponível em: <<https://10.6008/CBPC2318-2881.2021.001.0009>>. Acesso em: 07 jan. 2023.

MEDISON, R. G. Use of beneficial bacterial endophytes: A practical strategy to achieve sustainable agriculture. **AIMS Microbiology**, Springfield, USA, v. 8, n. 4, ago./dez. 2022, p. 624–643. Disponível em: <<https://doi.org/10.3934.202204>>. Acesso em: 07 jan. 2023.

MELNICK, R. L. et al. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**, Pennsylvania, USA, v. 46, jan./mar. 2008, p. 46-56. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.022>>. Acesso em: 27 dez. 2022.

MENEZES, C. B. A. **Taxonomia polifásica com ênfase em multilocus sequence analysis (mlsa) e bioprospecção de compostos bioativos de actinomicetos isolados de ambiente marinho**. 2015. 209f. Tese (Doutorado em Microbiologia, Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

MORAIS, J. F. et al. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista Uningá Review**, Maringá, PR, v.17, n.1, jan./dez. 2014, p. 27-34. Disponível em: <<https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/1486/1100>>. Acesso em: 25 ago. 2021.

MORENO, D. A. et al. Características macroscópicas de actinobactérias: valorizando a diversidade do semiárido nas aulas práticas de microbiologia. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, Curitiba, PR, v. 3, n. 3, jul./set. 2020, p. 1779-1785. Disponível em: <<https://doi.org/10.34188/bjaerv3n3-093>>. Acesso em: 23 set. 2021.

MURTADO, A. et al. Isolation and characterization endophytic bacteria as biological control of fungus *Colletotrichum* sp. on onion plants (*Allium cepa* L.). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, San Francisco, USA, v. 457, n. 1, 2020, p. 1-9.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/1755-1315/457/1/012043>>. Acesso em: 23 nov. 2022.

NALINE, M. S.; PRAKASH, H. S. Diversity and bioprospecting of actinomycete endophytes from the medicinal plants. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 64, out. 2016/jan. 2017, p. 261-270, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/lam.12718>>. Acesso em: 27 dez. 2022.

NOGUEIRA, T. A crise dos antibióticos. **Revista de Ciência Elementar**, Porto, POR, v. 5, n. 1 dez. 2016/mar. 2017, p. 1-5, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.24927/rce2017.013>>. Acesso em: 07 set. 2021.

NOUIOUI, I. et al. Genome-based taxonomic classification of Phylum of Actinobacteria. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, CH, v. 9, ago. 2018, p 1-29. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>>. Acesso em: 25 ago. 2022.

NOVITA, A.; BARSÍ, H. **Cultivation of Cocoa: Theobroma cacao L.** Edição 1. Medan: UMSU Press, fevereiro de 2021. p. 1-78.

OLIVEIRA, M.; PEREIRA, K. D. S.; ZAMBERLAN, C. R. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antibióticos: uma questão de saúde pública. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação- REASE**, Criciúma, SC, v. 6, n. 11, nov. 2020, p. 183-201. Disponível em: <<https://doi.org/10.29327/4426668>>. Acesso em: 20 nov. 2021.

OLIVEIRA, A. P. G et al. Importância das actinobactérias em processos ecológicos, industriais e econômicos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, GO, v.10, n.18, abr./jul. 2014 p. 3938-3952. Disponível em: <<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/MULTIDISCIPLINAR/importancia.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2022.

OUSANG, Y. et al. Effects of plants-associated microbiota on cultivation and quality of Chinese herbal medicines. **Chinese Herbal Medicines**, Beijing, CH, v. 12, n. 1, set. 2022/jan. 2023, p. 1-32. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chmed.2022.12.004>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

PAMPFILE, J. A. et al. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Revista Uningá**, Maringá, RJ, v. 53, n. 1, jul./set. 2017, p. 113-119. Disponível em: <[https://www.mastereditora.com.br/periodico/20170707\\_204627.pdf](https://www.mastereditora.com.br/periodico/20170707_204627.pdf)>. Acesso em: 12 nov. 2022.

PODOLICH, O. et al. First record of the endophytic bacteria of *Deschampsia antarctica* E. Desv. from two distant 2 localities of the maritime Antarctica. **BioRxiv**, v. 58, n. 1, Kyiv, UK, p. 1-7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/586099>>. Acesso em: 15 fev. 2022.

PROCOP, G. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

PURVES, K. et al. Using Molecular Networking for Microbial Secondary Metabolite Bioprospecting. **MDPI – Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, Glasgow, UK v. 6, n. 2, set. 2015/jan. 2016, p. 1-18. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/metabo6010002> >. Acesso em: 11 nov. 2022.

QUIN, R. A. et al. Ecological networking of cystic fibrosis lung infections. **Nature Partner Journal**, San Diego, EUA, v. 2, n. 4, dez. 2016, p. 1-11. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41522-016-0002-1>>. Acesso em: 14 out. 2022.

ROBINSON, R. J. et al. Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. **Plant and Soil**, Pennsylvania, USA, v. 405, n. 2, ago. 2016, p. 381–396. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s11104-015-2495-4>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

RODRIGUES, T. S. et al. Resistência bacteriana a antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: revisão integrativa. **Revista Prevenção de Infecção a Saúde**, Teresina, PI, v. 4, n. 1, jan. 2018, p. 1-17. Disponível em: <<https://doi.org/10.26694/repis.v4i0.7350>>. Acesso em: 06 ago. 2022.

SALO, E. N.; NOVERO, A. Identification and Characterisation of Endophytic Bacteria from Coconut (*Cocos nucifera*) Tissue Culture. *Tropical Life Sciences Research*, Filipinas, PHL, v. 31, n. 1, abr. 2020, p. 57-68. Disponível em: <<https://doi.org/10.21315/tlsr2020.31.1.4>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

SALWAN, R.; SHARMA, V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiology Research*, Basel, CH, v. 231, set./nov 2019, p. 1-18. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.10.011>>. Acesso em: 06 ago. 2022.

SANTOS, D. V. A. et al. Antibióticos através da abordagem do mecanismo da resistência bacteriana. **Ciência Atual**, Rio de Janeiro, RJ, v. 11, n. 1, jul. 2018, p. 02-14. Disponível

em: <<https://revista.saojose.br/index.php/cafsj/article/view/240>>. Acesso em: 20 nov. 2021.

SANTOS, L. M. Benefits Associated with the Interaction of Endophytic Bacteria and Plants. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**. São Leopoldo, RS, v. 61, jun. 2016/jul. 2018, p. 1-11. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160431>>. Acesso em: 19 dez. 2022.

SELIM, M. S. M.; ABDELHAMID, S. A.; MOHAMED, S. S. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, dez. 2021 p. 72-82. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

SINGH, B. P. et al. Microbial Secondary Metabolites: Recent Developments and Technological Challenges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, CH, v. 10, fev./abr. 2019, p. 1-2. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824523-1.00007-9>>. Acesso em: 11 nov. 2022.

SINGH, R.; DUBEY, A. K. Diversity and Applications of Endophytic Actinobacteria of Plants in Special and Other Ecological Niches. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, CH, v. 9, ago. 2018, p. 1-30. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>>. Acesso em: 19 nov. 2022.

SINGH, R. et al. Isolation and Characterization of Endophytes Bacterial Strains of *Momordica charantia* L. and Their Possible Approach in Stress Management. **Microorganisms**, Varanasi, India, v. 10, dez. 2021/ jan. 2022. p. 1-14. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020290>>. Acesso em: 12 out. 2022.

SIPRIYAD. Potential Antimicrobe Producer of Endophytic Bacteria from Yellow Root Plant (*Arcangelisia flava* (L.)) Originated from Enggano Island. **International Journal of Microbiology**, London, UK, v. 22, ago./nov. 2022, p. 1-11. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2022/6435202>>. Acesso em: 29 dez. 2022.

SOLYANIKOVA, I. P. et al. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-substituted analogs by actinobacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 100, n. 1, p. 155-164. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.02.028>>. Acesso em: 22 dez. 2022.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *Revista UNOPAR*, Londrina, PR, v. 16, n. 4, jan./mar. 2014, p. 345-

351 Disponível em: <<https://doi.org/10.17921/2447-8938.2014v16n4p%25p>>. Acesso em: 15 nov. 2022.

TALLEI, T. E et al. Endophytic Bacteria isolated from the leaf of Langusei (*Ficus minahassae* Tesym. & De Vr.) and their antibacterial activities. **Materials Science and Engineering**, San Francisco, USA, v. 796, n. 1, 2020, p. 1-7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/1757-899X/796/1/012047>>. Acesso em: 16 de out. 2022.

TABARES, J. A. G. et al. Evaluación agronómica de genotipos de *Theobroma cacao* L. en la Amazonia colombiana. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, Florencia, Colômbia, v. 19, n. 1 jan./jun. 2021, p. 244 - 255. Disponível em: <[https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)244-255](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)244-255)>. Acesso em: 16 de out. 2022.

TAPIA, C. A. L. Resistencia a antibióticos: cuando nuestro armamento se torna ineficiente. **Revista Digital Universitaria da Universidad Nacional Autónoma de México**, Mx, v. 20, n. 5, set./ out. 2019, p. 1-10. Disponível em: <<http://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n5.a4>>. Acesso em: 18 nov. 2021.

TEIXEIRA, A. R.; FIGUEIREDO, A. N. C.; FRANÇA, R. F. Resistência bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. *Revista Saúde em Foco*, Teresina, PI, v. 11, n. 1 set. 2019, p. 853-875. Disponível em: <<https://doi.org/10.29327/4426668>>. Acesso em: 16 de out. 2022.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 2, nov. 1994, p. 4673–4680, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

THOMPSON, J. F.; STEINMANN, K. E. Single Molecule Sequencing with a HeliScope Genetic Analysis System. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 92, n. 1, out. 2010. DOI 10.1002/0471142727.mb0710s92. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2020/8896738>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

TORRES, F. L. et al. Bioprospecção e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas do Cerrado. **CONCILIUM (BRASIL)**, Rio de Janeiro, RJ, v. 22, n. 2, jan./2022, p. 256-272. Disponível em: <<https://doi.org/10.53660/CLM-114-133>>. Acesso em: 12 dez. 2021.

UESUGI, C. H.; FREITAS, M. A.; MENEZES, J. R. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em Feijoeiro, em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 3, mai./jun. 2003, p. 324. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000300019>>. Acesso em: 29 dez. 2022.

VASILEVA, E. N. et al. Endophytic microorganisms in fundamental research and agriculture. **Ecological genetics**, Saint Petesburg, RUS, v. 17, n. 1, jan./mar. 2019 p. 19-32. Disponível em: <<https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32>>. Acesso em: 03 nov. 2022.

VERA-LOOR, M. A et al. Caracterización de bacterias endófitas formadoras de endosporas procedentes de *Theobroma cacao* L. en Quinindé, Esmeraldas, Ecuador. **Centro Agrícola**, Riobamba, EC, v. 1, jun. 2020/jun. 2021, p. 6-15. Disponível em: <<http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/proximos/cag04.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2022.

VIÉGAS, I. J. M. et al. Determinação do Folíolo Diagnóstico para Análise Nutricional em Plantas de Gengibre Ornamental. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, Belém, PA, v. 12, n. 2, mai./dez. 2021, p. 1-10. Disponível em: <<https://doi.org/10.37002/biobrasil.v12i2.2002>>. Acesso em 13 dez. 2022.

VIEIRA, P. N.; VIEIRA, S. L. V. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. **Arquivo de ciências da saúde UNIPAR**, Maringá, PR, v. 21, n. 3, set./dez. 2017 p. 209-211. Disponível em: <<https://doi.org/10.25110/arqsaude.v21i3.2017.6130>>. Acesso em: 18 nov. 2021.

VILLAS BOAS, D. F. et al. Microrganismos endofíticos como fonte de compostos de interesse medicinal – uma breve revisão. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, Uberaba, MG, v. 5, n. 1, jan/jun. 2020, p. 71-86. Disponível em: <<https://doi.org/10.18554/rbcti.v5i1.3600>>. Acesso em: 18 nov. 2021.

VOYTAS, D. Resolution and recovery of large DNA fragments. **Current Protocols in Molecular Biology**. 2.5A. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2000.

WEIL, R.; BRADY, N. **The Nature and Properties of Soils: Organisms and Ecology of the Soil**. 11 ed. Columbus: Pearson Education, 2016. v. 15.

WILSON, K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in molecular biology*, v. 2, n. 2, nov. 2001, 755-757. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.48.4.755-757.1984>>. Acesso em: 21 dez. 2022.

XIA, Y. et al. The Zoige pioneer plant *Leymus secalinus* has different endophytic bacterial community structures to adapt to environmental conditions. *PerrJ research*. Chengdu, CHI, v. 1, n. 1 mar./jun. 2023, p. 2-20. Disponível em: <<https://doi.org/10.7717/peerj.15363>>. Acesso em: 18 jun. 2023

ZHANG, C. et al. Potentials, Utilization, and Bioengineering of Plant Growth-Promoting *Methylobacterium* for Sustainable Agriculture. ***Sustainability***, Florida, USA, v. 13, fev./mar 2021, p. 1-12 Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/su13073941>>. Acesso em: 10 jan. 2023.

ZHAO, K. et al. Actinobacteria associated with *Glycyrrhiza inflata* Bat. are diverse and have plant growth promoting and antimicrobial activity. ***Scientific Reports***, London, UK, v. 8, abr./set 2018, p. 1-13. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32097-8>>. Acesso em: 13 set. 2022.

ZOTHANPUIA et al. Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. ***Microbial Cell Factories***, v. 17, n. 1, dez. 2018, p. 68-82. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0912-0>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

ZUBIR, I. et al. Endophytic bacteria from *Theobroma cacao* L. with antifungal activities against *Phytophthora palmivora*. ***Asian Journal Agric. and Biology***, Selangor, MY, v. 7, n. 3, jun./set. 2019, p. 404-411. Disponível em: <<https://doi.org/10.35495/ajab.2019.11.524>>. Acesso em: 29 dez. 2022.

ZWIETERING et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, jun. 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

**Anexo A- Provas bioquímicas das cepas Gram-negativas****Tabela 3.4** Provas bioquímicas realizadas nas cepas gram-negativo

<b>Cepa</b>	<b>Catalase</b>	<b>Citrato</b>	<b>Fenilalanina</b>	<b>Fermentação</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>
CP1A03	Negativo	Positivo	Negativo	Glicose	Positivo	Negativo
CP1A04	Positivo	Positivo	Negativo	Glicose	Positivo	Negativo
CP2A01	Positivo	Negativo	Negativo	Glicose	Positivo	Negativo
CP3A04	Positivo	Negativo	Negativo	Glicose	Positivo	Negativo
CP3A05	Positivo	Positivo	Negativo	Ausência	Positivo	Negativo
CP5A01	Positivo	Negativo	Negativo	Glicose	Negativo	Negativo
CP6A02	Positivo	Negativo	Negativo	Ausência	Positivo	Negativo