

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

GRACIELY GOMES CORRÊA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE
Caesalpinia pyramidalis Tul. DO BIOMA CAATINGA

RECIFE
2014

GRACIELY GOMES CORRÊA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA
DE *Caesalpinia pyramidalis* Tul. DO BIOMA CAATINGA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção parcial do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de Concentração: Microbiologia e Bioprocessos

Orientador (a): Profa. Dra. Janete Magali de Araújo

Co-orientador (a): Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima

**RECIFE
2014**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Corrêa, Graciely Gomes

Potencial biotecnológico de actinobactérias da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma Caatinga/ Recife: O Autor, 2014.

74 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Janete Magali de Araújo

Coorientadora: Gláucia Manoella de Souza Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia

1. Actinomycetales I. Araújo, Janete Magali de (orientadora) II. Lima, Gláucia Manoella de Souza (coorientadora) III. Título

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 091

GRACIELY GOMES CORRÊA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA
DE *Caesalpinia pyramidalis* Tul. DO BIOMA CAATINGA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Janete Magali de Araújo PhD
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr^o. Tiago Domingues Zucchi PhD
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)/Jaguariúna/SP

Prof. Dr^o. João Lúcio de Azevedo PhD
Universidade de São Paulo - USP

Recife, 24 de fevereiro de 2014.

*Esta dissertação foi realizada com todo
carinho, com ajuda de muitos amigos,
companheiros de profissão, pessoas que
me orgulho bastante de ter conhecido,
mas entre elas uma pessoa muito
especial que esteve sempre comigo e que
passou todo o seu amor pelas
actinobactérias, a professora Janete
Magali, a quem admiro bastante e
dedico este trabalho, ou melhor, como
ela sempre me fala, essa diversão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida, me proporcionando conhecimento e força nas minhas realizações e me mostrando sempre o melhor caminho a seguir. Estarás sempre no comando da minha vida.

Aos meus pais, Gracilene e José, ao meu irmão, Gleyton e minha cunhada, Luana, pelo apoio, carinho e paciência. A melhor família do mundo! Desculpem os estresses!

À minha orientadora Janete Magali de Araújo, por compartilhar comigo todo seu amor pelas actinobactérias e mostrar como é fantástico esse mundo microbiano, isso sempre me impulsionava a aprender mais e perder a hora várias vezes no laboratório. Ir muitos finais de semana e feriados só pela curiosidade do próximo passo. Um “boa tarde”, quando chegava às 9h. Ou uma bronca quando não cuidava devidamente dos meus “bichinhos”. Ou aquela velha frase: “Vocês já vão almoçar? Precisam aprender a viver a base de luz solar. Rsrs”. Nosso café diário.... Foi uma honra trabalhar com uma pessoa tão maravilhosa.

À minha co-orientadora Gláucia Manoella de Souza Lima, pelos ensinamentos, sugestões e muitas broncas que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Esse “co” não importa, para mim você sempre será minha orientadora também e escrevo isso de todo carinho.

Às minhas queridas Andréa Gomes e Rita de Cássia, minhas primeiras orientadoras da época de Faculdade, que me fizeram seguir o mundo da microbiologia. Seus ensinamentos serão eternos.

Aos professores que contribuíram em minha formação, Glícia Calazans e Ana Maria, que me fizeram ingressar na Biotecnologia Industrial desde a disciplina da Graduação, Alexandre Góes, Wagner, Sebastião, Márcia Vanusa, Teresinha, Ester Gouveia, Leonor, Gláucia Lima, Janete Magali, Tânia Stamford.

A Klayton, nosso secretário da pós-graduação, sempre muito solícito e competente. A quem “aperriamos” muito, mas que atendia com presteza aos nossos pedidos.

Aos meus amigos e familiares, especialmente pela minha ausência. Era perceptível e Deus é testemunha de como me machucava ter que negar os convites para sair, ir à praia, jogar vídeo game, andar de patins ou bicicleta, tomar um sorvete... Peço desculpas por isso, mas agradeço a compreensão e por nunca desistirem de mim, enfim, estarem presentes nos melhores e piores momentos de minha vida, senti muito este apoio em 2013, vocês estavam lá quando mais precisei e não me deixaram cair.

Aos meus colegas de mestrado e eternos amigos, Priscilla Moura, Temístocles Ítalo, Raquel Souza, Rafaela Lira, Ednaldo Santos, Lívia Caroline, Bruno Santos, Mariana Vidal, Márcia Silva, Vinicius de Moraes, Juliana, Almerinda Agrelli e Milca Lins. Muito bom ter estado com vocês e ter os conhecidos, turma sempre unida. Adoro a energia positiva que vocês me passam e o estímulo em prosseguir, as risadas no grupo de WhatsApp que nos fizeram ainda mais próximos. Turma perfeita!!

À minha amiga Milca Lins, é claro que essa chatinha precisava de um parágrafo especial, minha companheira de aventuras, minha confidente e minha grandeee amiga que me aturou esse tempo todo, dando toda a força do mundo, uma garota maravilhosa. Nossa saga dos feijõezinhos continua. Pelo menos ela aprendeu a fazer café depois de dois anos. Rsrs. Obrigada por todo o apoio!

Aos meus companheiros do Laboratório de Coleção e Genética de Micro-organismos, Emerson, sempre compartilhando minhas dúvidas e tentando saná-las; Diego do Peixe, esteve sempre lá para me fazer rir e esperar eu sair do laboratório altas horas; Yasmim dos Cachinhos, um amor de pessoa e muito prestativa; Raphael Ferrer, compartilhando nossas angústias de mestrado; Wanda, por cuidar tão bem dos meus bichinhos e compartilhar meus estresses; Wellma, por estar presente em momentos difíceis de minha vida e ter dado tanto apoio, amiga fora e dentro do lab; Diego Taffael, pelas trancinhas e mexer no meu cabelo; Carol, companheira pra todas as horas; Gustavo Pardal, que me acompanha desde a graduação, meu irmãozinho, que me dá muita preocupação, mas que me faz rir sempre; a professora Leonor, por tirar várias das minhas dúvidas e pelo seu carinho e ternura; Fafá, pela sua alegria e seu apoio; Jéssica e Nataliane, minhas amigas que admiro muito, bastante competentes, espero que Jéssica e Edilson tenham seus filhos lindos e saudáveis logo, torço muito por este casal; Kássia, Evelyn, Kathy, as meninas do CAV, uns amores, muito bom trabalhar

com elas; Sandrine, sempre disponível para tirar dúvidas; Ivana, sempre disponível; Eduardo; Glêzia; Eliz; Igor; Joselma; Rubênia; Karine; Marcela; Iasmin Tenente; Raphael de Manaus; Paulinha do Rio; Felipe; Thaís; Dayse; Thárcia; Amanda; e todos que passaram pelo laboratório a que tenho muito orgulho de ter compartilhado momentos felizes de minha vida, incluindo as disputas por times (é claro que o Santa Cruz é o melhor, nem precisa discutir), as festinhas organizadas, cafés, aniversários, cafés, vinhos e mais cafés.....

Ao professor Itamar e Zucchi, por terem aberto as portas do laboratório de Microbiologia Ambiental na Embrapa de Jaguariúna/SP e aos amigos que fizemos neste local: Rafaella, Camila, Paulinha, Danilo, Fábio, Harold, Vanessa, Suik, João, Rafael, Tati, Rafael Vasconcelos, Rafael do ônibus, Elke, Rodrigo Taketani, Natália, Rodrigo Mendes, Henrique e Celinha. Foi muito bom ser tão bem recebida e conhecer pessoas tão especiais. Espero que nos encontremos nesta longa jornada! Vocês foram parte essencial neste trabalho e dos meus sonhos, aproveitamos os ensinamentos de todos!

Ao CETENE, incluindo Gaby, Josy, Fábria, Diego e Doutora Janaína pelo auxílio com a microscopia eletrônica.

A CNPQ/CAPES pelo apoio financeiro concedido.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta com o desenvolvimento deste trabalho e compartilhando meus sonhos, meu MUITOOO OBRIGADA!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Graciely Gomes Corrêa

“Quando uma criatura humana desperta
para um grande sonho e sobre ele lança
toda a força de sua alma, todo o universo
conspira a seu favor.”

Johann Goethe

RESUMO

O bioma Caatinga é o principal ecossistema da Região Nordeste que apresenta características peculiares devido ao seu clima quente e seco, típico do semi-árido. As actinobactérias de regiões de condições extremas são importantes em decorrência dos mecanismos de adaptação que estimulam a produção de novos compostos com potencial biotecnológico. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar actinobactérias da rizosfera da Caatinga, além de determinar a atividade antimicrobiana. O isolamento dos micro-organismos rizosféricos foi realizado pela técnica de diluição seriada, utilizando diferentes temperaturas e meios de cultura. Foram realizados testes antimicrobianos para seleção de actinobactérias com atividade para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. No ensaio primário em blocos de gelose, foi selecionada a actinobactéria que apresentou melhor resultado no ensaio primário e, em seguida, realizado o ensaio secundário (fermentação), utilizando os meios MPE, M1, ISP3 e Ciclamina. A partir da fermentação da actinobactéria selecionada, no melhor meio de produção e tempo de fermentação, foram realizados experimentos de extração do princípio bioativo da biomassa e do líquido metabólico, em diferentes pHs. Em seguida, foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto, da biomassa e do líquido metabólico. A identificação das actinobactérias foi realizada pela técnica do microcultivo e análise molecular. Foram isoladas 96 actinobactérias, das quais 68% (65) foram oriundas da temperatura de 37° C e 46% (48) provenientes do meio de cultura HV-ágar. No ensaio em bloco de gelose, 55% (53) dos isolados apresentaram atividade contra pelo menos um dos micro-organismos testados. Após este ensaio, a actinobactéria 74 (HT 1A+17) foi selecionada para os testes secundários por apresentar excelentes halos de inibição frente às bactérias Gram positivas. Esta linhagem foi identificada como *Sreptomycetes* sp. através de testes moleculares e verificou-se que o meio MPE foi o melhor para a produção do biocomposto em 72 horas de fermentação, os melhores solventes foram acetona e hexano, ambos em pH 7,0, para extração da biomassa e do líquido metabólico, respectivamente. O isolado 74 (HT 1A+17) apresentou resultados promissores na produção do composto bioativo e estudos mais detalhados deverão ser realizados para melhor caracterização.

Palavras-chave: Micro-organismos rizosféricos. Metabólitos bioativos. Isolamento. Fermentação.

ABSTRACT

The Caatinga biome is the main ecosystems of the Northeast which has peculiar characteristics due to its hot and dry climate typical of semi-arid. The actinomycetes of regions of extreme conditions are important due to the adaptation mechanisms that stimulate the production of new compounds with biotechnological potential. Therefore, the aim of this work was to isolate and identify the rhizosphere actinomycetes of Caatinga, and to determine the antimicrobial activity. Isolation of rhizosphere microorganisms was carried out by using serial dilution, using different temperatures and different culture media. Antimicrobial tests for selection of actinomycetes were performed with activity for Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi. In the primary test blocks of agar, was selected actinobacteria showed the best result in the primary test and then performed secondary assay (fermentation), using the means MPE, M1, ISP3 and Ciclamycin. From the fermentation of selected, the best means of production and fermentation time, actinobacteria experiments of extracting bioactive principle of biomass and metabolic fluid, at different pHs were performed . Then, the minimum inhibitory concentration (MIC) of crude extract biomass and metabolic liquid was determined. The identification of actinomycetes was performed by the microculture and molecular analysis. 96 actinomycetes were isolated, of which 68% (65) were derived from the 37 ° C temperature and 46% (48) from the HV agar medium culture. In test agar block, 55% (53) of the isolates showed activity against at least one of the micro - organisms tested. After this test, the actinobacteria 74 (HT 1A +17) was selected for secondary testing by presenting excellent inhibition halos forward to Gram positive bacteria. This strain was identified as *Sreptomycetes* sp. via molecular tests and found that the best medium was MPE for the production of biocompound with 72 hours of fermentation, the best solvents were acetone and hexane, both at pH 7.0, for extraction biomass and metabolic liquid, respectively. The isolated 74 (HT 1A +17) showed promising in the production of bioactive compound results and more detailed studies should be conducted to better characterization.

Keywords: Rhizosphere micro-organisms. Bioactive metabolites. Isolation. Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 3.1 – Planta Caatingueira (<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.)..... | 20 |
| Figura 4.1 – Esquema para isolamento de actinobactérias da rizosfera..... | 25 |
| Figura 4.2 - Esquema do teste antimicrobiano do ensaio em bloco de gelose | 28 |
| Figura 4.3 - Esquema da fermentação e do teste de difusão em disco | 29 |
| Figura 4.4 - Técnica do microcultivo para identificação de actinobactérias..... | 32 |
| Figura 5.1 - Diversidade macroscópica de actinobactérias isoladas da rizosfera de <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul. A: Micélio aéreo. B: Reverso..... | 37 |
| Figura 5.2 – Porcentagem de isolados em diferentes meios de cultura..... | 37 |
| Figura 5.3 – Porcentagem de actinobactérias isoladas em diferentes meios de cultura e temperaturas..... | 38 |
| Figura 5.4 – Porcentagem das actinobactérias com atividade antimicrobiana para diferentes grupos de micro-organismos..... | 40 |
| Figura 5.5 – Análise estatística dos dados obtidos dos testes de atividade antimicrobiana por bloco de gelose. | 41 |
| Figura 5.6 – Atividade antimicrobiana de bloco de gelose da actinobactéria 74 (HT 1A+17) isolada da Caatinga. (A) <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA-86. (B) <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA UFPEDA-705..... | 42 |
| Figura 5.7 – Visualização através de microscopia óptica do microcultivo de actinobactérias isoladas da Caatinga. Isolados: A: <i>Streptomyces</i> sp.-02; B: Não | |

identificado-03; C: *Streptomyces* sp.-25; D: *Kitasatospora* sp.-64; E: Não
identificado -61; F: *Streptomyces* sp-70..... 46

Figura 5.8 – Visualização através de microscopia eletrônica de varredura do
microcultivo de actinobactérias isoladas da Caatinga. Isolados: A: *Streptomyces* sp.-
12; B: *Streptomyces* sp.-02..... 47

Figura 5.9 - Árvore filogenética ‘*Neighbor-Joining*’ referente às sequências do
gene 16S RNA mostrando as posições das linhagens isoladas da rizosfera da Caatinga
em relação a actinobactérias mais próximas depositadas no GenBank. *Nocardia* sp. e
Bacillus sp. foram incluídas para observar distanciamento filogenético..... 49

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 4.1 – Micro-organismos utilizados na atividade antimicrobiana..... | 27 |
| Tabela 4.2 - Listagem dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento do gene 16S rRNA das actinobactérias da Caatinga..... | 35 |
| Tabela 5.1 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto da biomassa e do líquido metabólico do isolado 74 (HT 1A+17) testado frente a <i>Staphylococcus aureus</i> | 43 |
| Tabela 5.2 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto da biomassa e do líquido metabólico do isolado 74 (HT 1A+17)..... | 44 |
| Tabela 5.3 – Identificação parcial das actinobactérias através do sequenciamento do gene 16S RNA..... | 48 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1 Geral..... | 17 |
| 2.2 Específicos..... | 17 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 18 |
| 3.1 O Bioma Caatinga..... | 18 |
| 3.2 A Planta Catingueira (<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.)..... | 19 |
| 3.3 A rizosfera e sua importância..... | 20 |
| 3.4 Actinobactérias..... | 21 |
| 3.5 Metabolismo secundário..... | 22 |
| 3.6 Resistência bacteriana..... | 23 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| 4.1 Amostragem..... | 25 |
| 4.2 Isolamento de actinobactérias..... | 25 |
| 4.3 Avaliação do pH do solo rizosférico..... | 26 |
| 4.4 Código dos isolados | 26 |
| 4.5 Seleção de actinobactérias com atividade antimicrobiana..... | 26 |
| 4.5.1 Micro-organismos teste..... | 26 |
| 4.5.2 Ensaio primário em meio sólido..... | 27 |
| 4.5.3 Testes estatísticos para seleção de linhagens com maior potencial antimicrobiano..... | 28 |
| 4.5.4 Ensaio secundário em meio líquido..... | 28 |
| 4.6 Extração do metabólito bioativo..... | 30 |
| 4.6.1 Extração de metabólitos bioativos da massa celular..... | 30 |
| 4.6.2 Extração de substâncias bioativas do líquido metabólico..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 4.7 Determinação da Concentração Inibitória..... | 31 |
| 4.8 Identificação das actinobactérias..... | 31 |
| 4.8.1 Microcultivo..... | 31 |
| 4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura..... | 32 |
| 4.8.3 Identificação molecular através do sequenciamento do gene 16S RNA..... | 33 |
| 4.8.3.1 Extração de DNA total..... | 33 |
| 4.8.3.2 Reação de amplificação de DNA..... | 34 |
| 4.8.3.3 Purificação de DNA e reações de sequenciamento..... | 34 |
| 4.8.3.4 Alinhamento e análise de sequências..... | 35 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 36 |
| 5.1 Isolamento de actinobactérias..... | 36 |
| 5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana..... | 39 |
| 5.2.1 Ensaio primário em meio sólido..... | 39 |
| 5.2.2 Análises estatísticas..... | 40 |
| 5.2.3 Ensaio secundário..... | 42 |
| 5.3 Obtenção do extrato bruto – Biomassa e Líquido Metabólico..... | 43 |
| 5.4 Atividade antimicrobiana dos extratos..... | 44 |
| 5.5 Identificação das actinobactérias..... | 45 |
| 5.5.1 Microcultivo..... | 45 |
| 5.2.2 Análise molecular..... | 47 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 50 |
| 7 PERSPECTIVAS..... | 51 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 52 |
| ANEXOS..... | 63 |
| APÊNDICES..... | 68 |

1. INTRODUÇÃO

A Caatinga, termo originário do tupi-guarani que significa mata branca, é o principal ecossistema existente na Região Nordeste, estendendo-se pelo domínio de climas semi-áridos, que compreende os estados do Ceará, mais da metade da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte, quase metade de Alagoas e Sergipe, além de pequenas áreas de Minas Gerais e do Maranhão, com um bioma, que apresenta grande variedade de paisagens, relativa riqueza biológica e endemismo (IBAMA, 2012). Esta área compreende aproximadamente 800.000 km², que corresponde a quase 10% do território brasileiro (IBGE, 2012), com temperaturas médias anuais elevadas e baixo índice pluviométrico que varia entre 250 e 800 mm (MAIA, 2004).

Esse bioma possui espécies que apresentam adaptações à deficiência hídrica, entretanto existem poucos estudos sobre o potencial biotecnológico de micro-organismos desta região de condições extremas, havendo a hipótese de que os micro-organismos também desenvolvem mecanismos de adaptação para sobrevivência às condições adversas, assim como as plantas dessa região (GIULIETTI, 2004; FERREIRA, 2012).

A região onde se encontra o solo e as raízes é designada de rizosfera e a população microbiana encontrada nesta região é consideravelmente maior do que no solo isento de raízes; as diferenças detectadas são quantitativas e qualitativas, havendo maior predominância de bactérias. Seu crescimento é estimulado pelas substâncias nutritivas liberadas pelo tecido vegetal (ex: aminoácidos, vitaminas e outros alimentos), ou seja, é nas imediações das raízes que os micro-organismos encontram os substratos necessários para sua proliferação. A rizosfera afeta intensamente a atividade da microbiota por possuir características diferentes do solo distante das raízes (PELCZAR, 1981; CANOVA, 2009; MELO e AZEVEDO, 2008).

As variações nas condições climáticas podem favorecer, de modo seletivo, certos tipos fisiológicos, e em solos secos e quentes ocorrem inúmeras actinobactérias, da ordem de milhões por grama de solo, sendo os gêneros mais predominantes *Nocardia*, *Streptomyces* e *Micromonospora* (PELCZAR, 1981).

As actinobactérias, anteriormente denominadas de actinomicetos, compreendem um grande grupo de bactérias filamentosas Gram-positivas com elevado conteúdo de G+C (guanina + citosina) em seu DNA, formam hifas multinucleadas, que se ramificam constituindo o micélio (VENTURA et al., 2007; STOHL et al., 2004).

As actinobactérias se destacam pela produção de metabólitos secundários com aplicação em diversas áreas industriais, como: alimentícia, farmacêutica e na agricultura, entre outros (LAZZARANI et al., 2000). Apesar de sua aplicação em diversos setores, a característica mais notável deste grupo de bactérias é seu grande potencial em produzir antibióticos (AZUMA, 2011; PELCZAR, 1981). Cerca de 50% dos antibióticos conhecidos são produzidos por actinobactérias e desses um único gênero, *Streptomyces*, é responsável por 90% destes metabólitos bioativos (ZUCCHI, 2011). Um fato interessante é que este gênero produz inúmeros antibióticos como: aminoglicosídeos, macrolídeos, ansamicinas, cefalosporinas, poliênicos, e outros (MELO, 2009).

Diante dessas características, uma estratégia para se buscar compostos ainda desconhecidos é isolar micro-organismos a partir de ambientes pouco explorados (MENDES, 2010). Pesquisas com actinobactérias de ambientes inexplorados tem recebido considerável atenção devido a sua grande diversidade e atividade biológica, principalmente, em decorrência de produzirem novos compostos bioativos. Existem diversos estudos a respeito desses micro-organismos em diferentes locais considerados ambientes extremos, como por exemplo, nas regiões entre-marés, manguezais, desertos, nas geleiras da Antártica, entre outros (AZUMA, 2011; MANGAMURI, 2012). Estudos recentes vêm sendo desenvolvidos sobre a biodiversidade e bioprospecção de actinobactérias da Caatinga do Nordeste brasileiro pela EMBRAPA/Jaguariúna, com excelentes resultados.

Desta forma, acredita-se que grupos microbianos adaptados às condições extremas possam ser fontes de metabólitos secundários de importância biotecnológica, assim sendo, o conhecimento da diversidade de actinobactérias da Caatinga se apresenta como uma área promissora de exploração, especialmente porque este bioma apresenta características únicas, sendo o foco deste trabalho.

Conhecer a biodiversidade microbiana do semi-árido é um passo importante para que seus recursos genéticos possam ser aproveitados de maneira sustentável, contribuindo para o desenvolvimento da biotecnologia. A biodiversidade da rizosfera e sua prospecção quanto à produção de metabólitos secundários de interesse agrícola e medicinal podem trazer benefícios econômicos e estratégicos para o nordeste brasileiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Determinar o potencial biotecnológico de actinobactérias isoladas da rizosfera da Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) pertencente ao bioma Caatinga.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar actinobactérias do solo rizosférico da Catingueira;
- Determinar a atividade antimicrobiana;
- Realizar a extração dos metabólitos bioativos da linhagem que apresentar melhor atividade antimicrobiana;
- Identificar as actinobactérias isoladas por meio de técnicas clássicas e moleculares.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O Bioma Caatinga

Caatinga em tupi-guarani significa “mata branca”, devido ao aspecto de sua vegetação em época de seca, em que as plantas perdem as folhas e os galhos ficam acinzentados. Apesar de toda a aridez, a região é rica em biodiversidade animal e vegetal, pois abriga 1/3 de espécies endêmicas exclusivamente brasileiras, ou seja, elas só existem na Caatinga. De forma geral, a vegetação é formada por arbustos, árvores baixas, retorcidas e cheias de espinhos ou cactos, todas adaptadas ao clima quente e seco (IBAMA, 2012).

As temperaturas médias anuais são elevadas, podendo chegar a 45° C durante o verão. O clima é semiárido e o solo, raso e pedregoso, é composto por vários tipos diferentes de rochas (IBGE, 2012).

Esse ecossistema possui um alto poder de resiliência, que é a capacidade de superação, refletido pela ocorrência de chuvas, que mesmo em baixas intensidades, produzem uma rápida resposta na vegetação nativa, que de seca, torna-se revigorante e verde. Isso ocorre em virtude de adaptações evolutivas que essas espécies vegetais passaram ao longo do tempo para sobreviver em um ambiente de condições tão estressantes (SILVA et al., 2011).

O uso insustentável do solo e recursos naturais ao longo de centenas de anos de ocupação, associado à imagem de local pobre e seco, fazem com que a Caatinga esteja bastante degradada. Entretanto, pesquisas recentes vêm revelando a riqueza particular do bioma em termos da biodiversidade e fenômenos característicos (SCHISTEK et al., 2012).

De acordo com Leal et al. (2003), o estudo e a conservação da diversidade biológica da Caatinga é um dos maiores desafios da ciência brasileira e atualmente constitui uma grande área de pesquisa. A Caatinga é a única grande região natural brasileira cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional e é proporcionalmente a menos estudada entre as regiões naturais brasileiras, com esforço científico concentrado em alguns poucos pontos em torno das principais cidades. Esta região natural brasileira é a menos protegida, pois as unidades de conservação cobrem menos de 2% do seu território e continua passando por um extenso processo de alteração e deterioração ambiental provocado pelo uso insustentável dos seus recursos

naturais, o que está levando a uma rápida perda de espécies únicas, além da eliminação de processos ecológicos chaves e à formação de extensos núcleos de desertificação em vários setores da região.

3.2 A Planta Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.)

Popularmente conhecida como catingueira ou catinga-de-porco, catingueira-das-folhas-largas, mussitaiba, pau-de-porco, ou pau-de-rato, cujo nome botânico é *Caesalpinia pyramidalis* Tul., é uma espécie de ampla distribuição no bioma caatinga, podendo ser encontrada nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (LIMA, 1996).

Caesalpinia pyramidalis Tul. é uma árvore de pequeno porte que cresce até atingir 4m de altura. As folhas são bipinadas e pequenas e as flores, amareladas, estão reunidas em inflorescências, formando cachos. O fruto é uma vagem achatada, de cor escura e, quando madura, se abre para liberar as sementes. O florescimento acontece no período de dezembro a fevereiro e a frutificação ocorre no período de janeiro a março (EMBRAPA, 2012).

A catingueira é uma árvore típica do semiárido e de grande valor econômico devido a seus múltiplos usos na agricultura familiar. É uma árvore rústica, muito apropriada para reflorestamento de áreas degradadas, além de apresentar um grande potencial forrageiro, madeireiro e medicinal (BRASIL, 2013). É uma das plantas sertanejas cujos gomos brotam nas primeiras manifestações de umidade, portanto é uma anunciadora do período de chuvas. A madeira é recomendada para lenha, carvão e as folhas fenadas constituem boa forragem, enquanto as flores, folhas e cascas são usadas no tratamento das infecções catarrais e diarreias (BRAGA, 1976).

Com a casca do caule, pode ser preparado o decocto usado externamente no tratamento de reumatismo e inchaço e pode-se beber para tratar gastrite, tosse, congestão, diarreia e reumatismo. O lambedor é usado no tratamento de tosse, catarro e gripe, enquanto as cascas são usadas no tratamento de infecções urinárias. Com a flor e as folhas, pode ser preparado um chá ou um lambedor que é utilizado no tratamento de gripe e hepatite ou ainda como expectorante e analgésico (UFRPE, 2010).

Figura 3.1 – Planta Caatingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.)



Fonte: <http://www.onordeste.com/onordeste/enciclopediaNordeste/index.php?titulo=Catingueira,+pau-de-rato<r=c&id_perso=3719>. Acesso em: 07 dez 2012.

3.3 A rizosfera e sua importância

A rizosfera é a região sob influência das raízes que abriga grande diversidade de micro-organismos do solo (VASCONCELOS, 2008). Os exsudatos radiculares influenciam o crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera pela alteração do ambiente do solo circundante, servindo como substrato para crescimento seletivo de micro-organismos do solo, capazes de utilizar eficientemente determinado substrato (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

Os exsudatos radiculares contém uma miscelânea de compostos como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, vitaminas e outros compostos biologicamente ativos, sendo que a composição dos exsudatos sofre mudanças em várias fases do desenvolvimento da planta (PEREIRA, 2000). Os exsudatos se difundem até distâncias distintas através do meio adjacente, representando um nicho bastante atraente para os micro-organismos, onde os mais diversos tipos de interações podem ocorrer entre estes e as plantas, assim como entre os diversos membros da microbiota (CARDOSO E FREITAS, 1992).

3.4 Actinobactérias

As actinobactérias, anteriormente denominadas actinomicetos, são representantes de um grupo extremamente diverso de bactérias filamentosas Gram-positivas, pertencentes a ordem Actinomycetales, que são geralmente aeróbias, e se caracterizam pelo alto teor de guanidina e citosina no DNA. O gênero mais conhecido é o *Streptomyces*, que contém mais de 600 espécies, todas com um conteúdo G+C caracteristicamente elevado (69-73%). Apresentam metabolismo extremamente rico e, frequentemente, acompanhado por produção de metabólitos secundários de extrema diversidade química. Estes micro-organismos ocorrem em diferentes habitats e são encontrados frequentemente no solo, sendo capazes de degradar uma grande variedade de substâncias orgânicas por meio de enzimas extracelulares. As actinobactérias possuem também importante papel na indústria como produtoras de antibióticos, como a estreptomicina, eritromicina, tetraciclina, entre outros (HOGG, 2005; GONZALEZ, 2005).

Esse grupo de bactéria filamentosa apresenta morfologia bem diversificada e de acordo com o gênero, apresentam esporos esféricos ou bacilares, e formam filamentos longos com hifas, que compõem o micélio aéreo e substratal de coloração variada (FLARDH E BUTTNER, 2009). A maioria forma esporos de formas variáveis, que são utilizadas na classificação dos subgrupos. O odor característico de terra molhada é decorrente da produção de uma série de metabólitos, denominados geosminas (MADIGAN et al., 2010).

As actinobactérias apresentam crescimento vegetativo na forma de micélio com hifas ramificadas com 1 µm de diâmetro, geralmente formam colônias pequenas e bem aderidas ao substrato. Possuem esporos de disseminação, os quais podem ser encontrados na parte aérea do micélio ou nas hifas encontradas no substrato, ou em ambos locais. Podem ainda se agrupar em conídios com diferentes formas ou em esporângios ou ainda apresentar esporos com motilidade em algumas espécies. Formam também estruturas de sobrevivência capazes de conferir proteção em ambientes inóspitos (HOLT et al., 1994).

Essas bactérias são muito versáteis metabolicamente, o que possibilita a utilização de muitas fontes de carbono, podendo ser heterotróficos ou quimiotróficos (MELO, 2009).

Segundo o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012), as actinobactérias compreendem 5 classes, 19 ordens, 50 famílias e 221 gêneros, dentre estes o gênero *Streptomyces* se destaca com um maior número de espécies.

Quando cultivadas em meio de cultura sólido, a rede de ramificações de hifas desenvolvidas pelas actinobactérias crescem tanto na superfície do meio de cultura quanto dentro do ágar para formar o micélio substratal. Muitas actinobactérias têm micélio aéreo, que se desenvolve na superfície do meio de cultura formando filamentos finos que podem originar esporos chamados conídios ou conidiósporos no final dos filamentos. Se os esporos se encontram em um esporângio, eles são chamados esporangiósporos. Esporos de actinobactérias desenvolvem-se pela formação de hifas septadas em alguns filamentos, usualmente em resposta à diminuição de nutrientes. A maioria não é resistente ao calor, mas suportam bem a dessecação e, portanto, têm valor adaptativo considerável (PRESCOTT et al., 1999), podendo auxiliar na sobrevivência das espécies durante a estiagem (VENTURA et al., 2007).

Esses micro-organismos são amplamente conhecidos por seu potencial na produção de moléculas biotivas, fruto de seu metabolismo secundário (MENDES, 2010). São caracterizados como os maiores produtores de antibióticos, com mais de 4600 compostos conhecidos com destaque para o gênero *Streptomyces* que é o principal produtor destes metabólitos bioativos. Existe uma grande variedade de compostos bioativos produzidos por uma mesma linhagem de *Streptomyces*, como também um mesmo composto sintetizado por diferentes estirpes, levando assim, a uma variabilidade química natural (WAKSMAN et al., 2010).

O isolamento dessas bactérias filamentosas com o objetivo de se estudar sua ecologia e buscar novas espécies e novas moléculas com potencial aplicação na biotecnologia especialmente em biomas com forte endemismo, como a Caatinga, é importante para o conhecimento e utilização da biodiversidade endêmica desse ambiente (LIRA-CADETE et al., 2011).

3.5 Metabolismo secundário

O metabolismo secundário de micro-organismos pode ser visto como a produção de compostos que aparentemente não exercem uma função para o organismo, já que este pode sobreviver mesmo sem a sua formação. Assim, uma das justificativas para a produção destas substâncias seria que, por serem produzidas dentro de uma série de

reações bioquímicas que ocorrem nas células, quando o resultado é um produto que favorece a sobrevivência, este mecanismo é incorporado às reações primárias, como os pigmentos, que protegem contra os danos da luz ultravioleta e são importantes fatores de virulência. Além do que, ao se esgotar um nutriente vital, o metabolismo secundário mantém os mecanismos essenciais para a multiplicação celular, ativando outras vias para a sua produção, principalmente no que diz respeito à produção de enzimas (ZHANG, 2009).

É bem estabelecido que micro-organismos, e em especial as actinobactérias, são uma fonte ilimitada de produtos naturais, como os metabólitos secundários que são importantes fontes de compostos com potencial terapêutico (WU et al., 2007).

Os produtos naturais permanecem como as mais importantes fontes de antibióticos e as actinobactérias são amplamente conhecidas por seu potencial na produção de moléculas biotivas, fruto deste metabolismo secundário (BULL e STARCH, 2007; MENDES, 2010).

3.6 Resistência bacteriana

As bactérias surgiram há cerca de 3,5 bilhões de anos, em ambiente hostil: temperaturas altíssimas, radiações ultravioletas e cósmicas, tempestades e falta de nutrientes. Elas superaram todos os obstáculos e evoluíram para ocupar hoje todos os habitats, até aqueles de condições mais extremas. Seu grande potencial de adaptação está associada à estrutura genômica, que garante a troca de genes entre as bactérias, usando para isso elementos não cromossômicos: plasmídios, transposons e até bacteriófagos. Este último destroem as bactérias hospedeiras, mas podem carregar e espalhar genes bacterianos (ANTONIO et al., 2009).

Existem provas, cada vez mais irrefutáveis, de que o mau uso de antimicrobianos é o principal responsável pela amplificação da resistência bacteriana. A decisão terapêutica sobre eventual prescrição de antibióticos deve fundamentar-se em real indicação, e a seleção dos mesmos deve levar em conta os malefícios da aplicação inadequada de fármacos (ZIMERMAN, 2010).

Os mecanismos de resistência dos micro-organismos incluem a produção de enzimas que inativam as drogas, através da alteração do sítio-alvo e da absorção ou do efluxo das drogas (TRABULSI, 2008; TORTORA, 2012; CLSI, 2010).

Atualmente estamos diante de um decréscimo da eficácia de drogas outrora muito potentes, com o reaparecimento de micro-organismos resistentes a todos os fármacos disponíveis, aumentando o risco de regressão à era pré-antibiótica, em que muitas pessoas morriam por infecções não tratáveis (DIAS e MONTEIRO, 2010).

Neste sentido, a seleção de espécies microbianas é um aspecto importante uma vez que não existe uma fonte notável para a produção de metabólitos secundários estruturalmente diversos que apresentam atividade biológica de relevância farmacêutica (BERDY, 2005).

Portanto, os problemas de resistência, a sensibilidade do paciente e incapacidade de controlar certas doenças infecciosas tem dado um impulso para a busca contínua de novos antibióticos em todo o mundo (ARASU, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

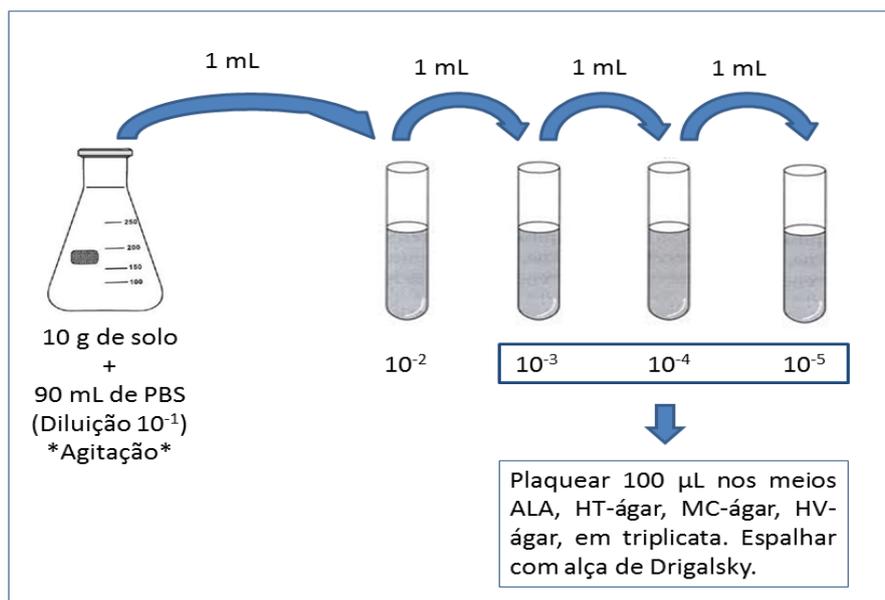
4.1 Amostragem

Para o isolamento de actinobactérias da rizosfera da planta Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) foi utilizada uma amostra de solo, proveniente da região semi-árida de áreas pouco impactadas da Caatinga, coletada no período de inverno (agosto/2011). A coleta foi realizada por pesquisadores da EMBRAPA/Jaguaríuna - São Paulo.

4.2 Isolamento de actinobactérias

O processamento da amostra de solo da rizosfera (figura 4.1) foi efetuado com 10 g do solo em 90 mL de solução salina estéril - tampão PBS (Anexo A) seguido de homogeneização por 10 a 15 minutos. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-5} . A partir das diluições de 10^{-3} a 10^{-5} , foram plaqueados 100 μ L de cada amostra em diferentes meios de cultura sólidos: ALA (Anexo B); HT-ágar (Anexo C); MC-ágar (Anexo D); HV-ágar (Anexo E) contendo nistatina (100 μ g/mL). As placas foram cultivadas a 30° C e 37° C por até trinta dias. O plaqueamento foi realizado em triplicata e as contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) foram efetuadas a cada 24 h.

Figura 4.1 – Esquema para isolamento de actinobactérias da rizosfera.



4.3 Avaliação do pH do solo rizosférico

Para a avaliação do pH do solo foi utilizado 1 g de solo em 25 mL de tampão PBS. A amostra foi agitada vigorosamente por 1 minuto e permaneceu em repouso por 15 minutos. Esta etapa foi realizada quatro vezes. Após 30 minutos de decantação da amostra foi aferido o pH, utilizando o pHmetro.

4.4 Código dos isolados

Após o isolamento, as actinobactérias foram nomeadas com códigos para facilitar a sua identificação. As primeiras letras foram referentes ao meio de isolamento; o número inicial, a placa, já que o experimento foi realizado em triplicata; em seguida, a diluição: A para a diluição 10^{-3} , B para a diluição 10^{-4} , C para a diluição 10^{-4} ; a temperatura de 30° C foi identificada pelo símbolo (-) e a 37° C pelo (+); o último número refere-se à ordem em que foi isolado naquela placa. Em alguns casos, foram adicionadas as letras (a), (b), (c) em seguida ao código quando foram purificados actinobactérias distintas de um único isolado. O Apêndice A apresenta um exemplo do código utilizado.

4.5 Seleção de actinobactérias com atividade antimicrobiana

4.5.1 Micro-organismos teste

Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizadas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduriforme da Coleção de Micro-organismos – UFPEDA do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Micro-organismos utilizados na atividade antimicrobiana.

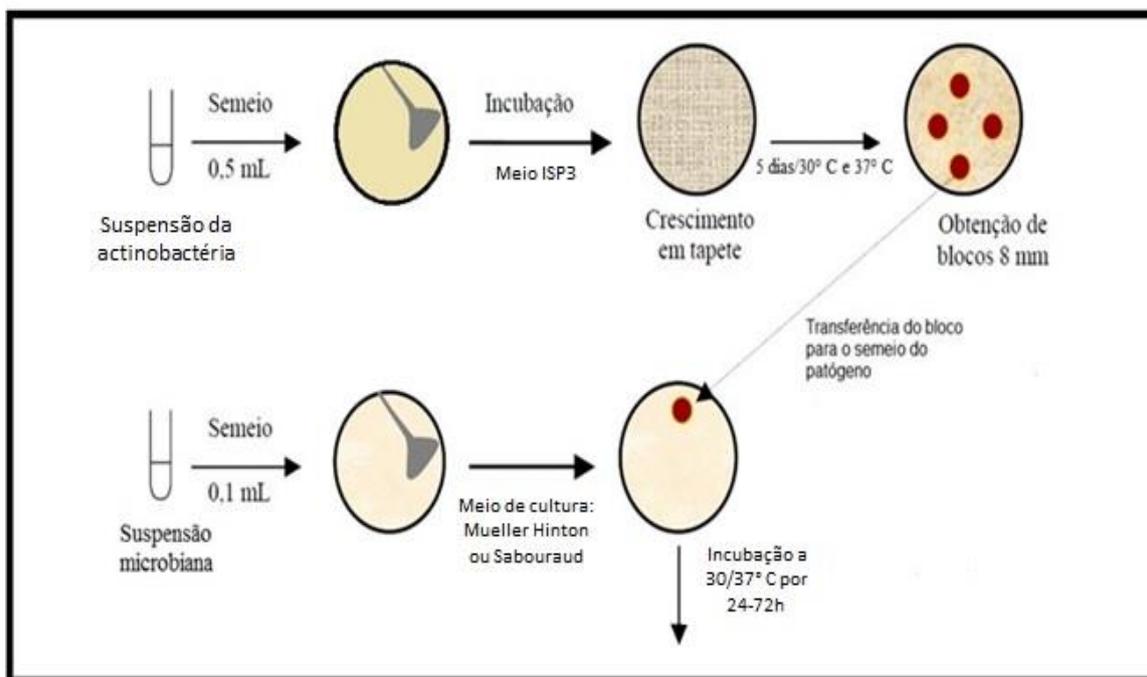
| Micro-organismos | UFPEDA |
|-----------------------------------|--------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | 86 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 02 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA | 705 |
| <i>Escherichia coli</i> | 224 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 396 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 2003 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 2331 |
| <i>Candida albicans</i> | 1007 |

4.5.2 Ensaio primário em meio sólido

O ensaio primário foi realizado em duas etapas: a primeira foi o crescimento em forma de tapete pela adição de uma suspensão de esporos de cada actinobactéria que foi espalhada com auxílio da alça de Drigalski em placas de Petri contendo 15 mL de meio ISP-3 e cultivadas por 5 a 10 dias a 30° C e 37° C. A segunda etapa foi o teste dos blocos de gelose (8 mm de diâmetro) que foram removidos para realização da atividade antimicrobiana.

Utilizando uma suspensão de cada micro-organismo teste (10^8 UFC/mL que corresponde à escala 0,5 de Mac Farland), foram retirados 100 µL e adicionados às placas contendo os meios de cultura específicos, Mueller-Hinton (Anexo F) e Sabouraud-ágar (Anexo G) para bactérias e fungos, respectivamente. Em seguida, blocos de gelose de cada actinobactéria foram colocados sobre as placas já inoculadas com cada micro-organismo teste, que foram cultivadas por 24-72 h a 30 e 37° C, dependendo do micro-organismo teste. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados determinados pela medida dos diâmetros dos halos de inibição (mm) (figura 4.2) (ICHIKAWA et al., 1971).

Figura 4.2 - Esquema do teste antimicrobiano do ensaio em bloco de gelose (BERNARDO, 2012 modificado)



4.5.3 Testes estatísticos para seleção de linhagens com maior potencial antimicrobiano

Os testes estatísticos em relação à atividade antimicrobiana, frente a diferentes micro-organismos patógenos, foram realizados visando à seleção da linhagem com maior potencial de inibição. A análise de variância ($p < 0,05$) e o teste de Tukey (5%) foram realizados de acordo com Bluman (2001) no programa Excel 2010 e Minitab versão 15.

4.5.4 Ensaio secundário em meio líquido

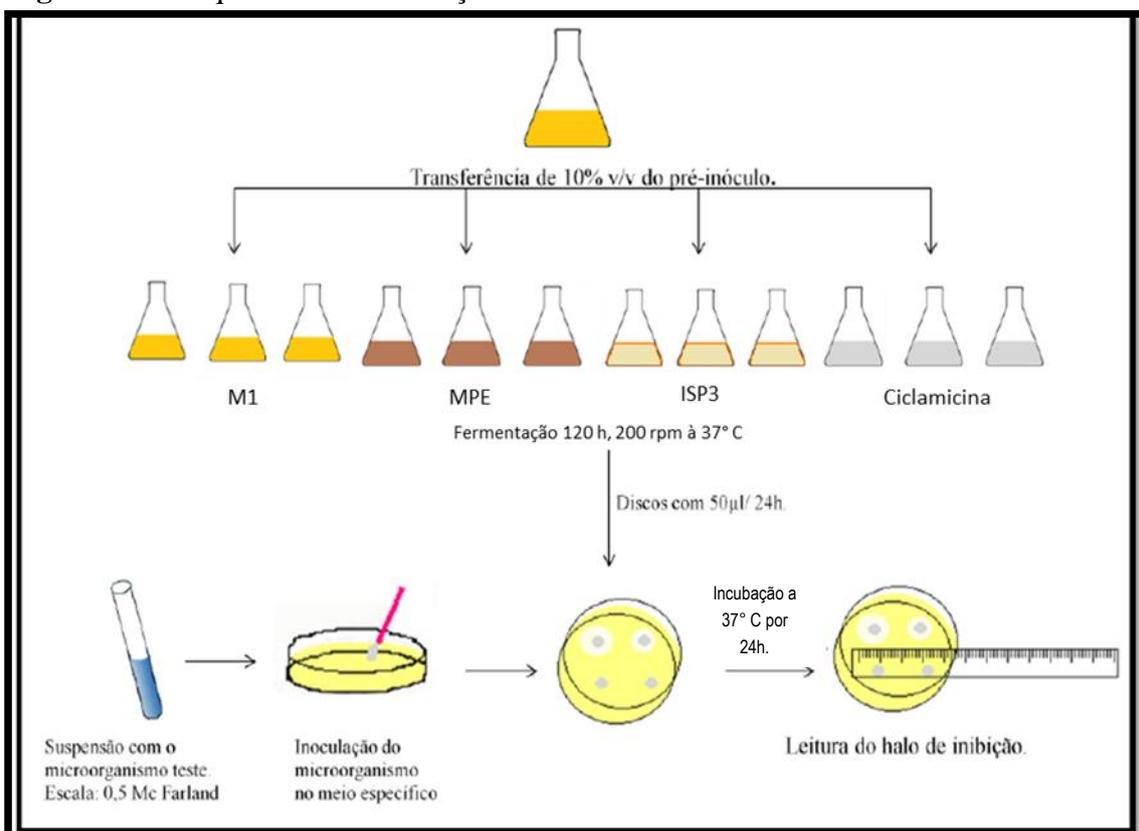
Este ensaio tem a finalidade de avaliar qual o melhor meio de fermentação e tempo para produção do metabólito bioativo. Para isto, foi selecionada a linhagem que apresentou melhor atividade antimicrobiana no ensaio primário.

Para obtenção do pré-inóculo, a estirpe foi cultivada em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios líquidos MPE (Anexo H), M1 (Anexo I), ISP₃ (Anexo J) e Ciclamicina (Anexo K), os quais foram mantidos sob agitação (200 rpm), a 37° C por

48 horas. Em seguida, 10% (v/v) do pré-inóculo foram transferidos para erlenmeyers (250 mL), contendo 50 mL dos mesmos meios para realizar a fermentação.

A cada 24 horas de cultivo, alíquota (1 mL) do mosto fermentado foi retirado para avaliar pH, biomassa e atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos teste que se apresentaram sensíveis no bloco de gelose. Cada alíquota foi centrifugada (13147,1 xg por 5 min) para separar o líquido metabólico da massa celular e discos de papel de 8 mm de diâmetro foram umedecidos com 50 µL do líquido fermentado e, em seguida, transferidos para placas de Petri contendo 10 mL dos meios de cultura específicos que foram previamente semeados com 100 µL de suspensões padronizadas de cada micro-organismo teste (10^8 UFC/mL), conforme descrito no item 4.4.2.. As placas de Petri foram mantidas por 2 horas sob refrigeração a 4° C para permitir a difusão do composto bioativo (EL-NAGGAR, 2006). Em seguida, as placas foram cultivadas a 37° C por 24 horas. O teste foi realizado em duplicata e os resultados determinados como a média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição em milímetro (figura 4.3) (BAUER et al., 1966).

Figura 4.3 - Esquema da fermentação e do teste de difusão em disco.



4.6 Extração do metabólito bioativo

Após a fermentação, o líquido metabólico foi separado da massa celular por centrifugação a 13147,1 xg durante 5 min e em seguida realizada a extração do metabólito bioativo da actinobactéria selecionada.

4.6.1 Extração do metabólito bioativo da massa celular

A massa celular foi tratada com solventes miscíveis em água: acetona, etanol e metanol, em três diferentes pHs 2,0, 7,0 e 9,0 para extração do princípio bioativo. A cada 1 g de peso úmido da massa celular foram adicionados 10 mL de cada solvente em diferentes pHs (ajustados previamente) e colocados sob agitação por 20 minutos a 180 rpm para desidratação da biomassa e extração dos metabólitos bioativos intracelulares. Em seguida, foi centrifugado, a fim de separar a fase líquida, extrato do solvente, da fase sólida. A fase líquida foi transferida para armazenamento em recipiente âmbar e o pH reajustado para 7,0. Discos de papel (8 mm) foram umedecidos com 50 µL de cada extrato e realizado o ensaio antimicrobiano como citado anteriormente (item 4.4.4).

4.6.2 Extração de substâncias bioativas do líquido metabólico

Para extração do composto bioativo do líquido metabólico o pH foi ajustado para 2,0 e 9,0, além de 7,0 que foi o pH final da fermentação. Em seguida, cada solvente: acetato de etila, clorofórmio e hexano, foi adicionado ao líquido metabólico na proporção de 2:1 (v/v), para extração do princípio bioativo, os quais foram submetidos à agitação por 20 minutos a 180 rpm. Após este processo, a fase aquosa formada pelo líquido metabólico esgotado e a fase orgânica contendo o solvente com o produto bioativo, foram separados para realização do teste antimicrobiano. O pH dos extratos e do líquido metabólico esgotado foi reajustado para 7,0 e utilizado 50 µL de cada fase que foram adicionados a discos de papel seguido do ensaio antimicrobiano, como citado anteriormente (item 4.4.4).

4.7 Determinação da Concentração Inibitória

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi realizada pela técnica de microdiluição, em placas com 96 poços, conforme o estabelecido no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). Neste ensaio, foram distribuídos volumes de 100 µL de meio líquido Mueller Hinton em todos os poços e, em seguida, adicionados 100 µL de cada amostra nos poços da coluna 3 e realizada a microdiluição até a coluna 11, obtendo-se concentrações decrescentes da amostra. A primeira coluna correspondente ao controle negativo e contendo apenas o meio de cultura. Na segunda coluna, o controle do solvente, onde foi adicionado 10 µL de DMSO (dimetilsulfóxido). O poço 12 correspondia ao controle positivo. Os poços de 2 a 12 foram inoculados com 10 µL da suspensão microbiana padronizada. O ensaio foi realizado em duplicata para cada micro-organismo teste. As microplacas foram cultivadas a 37° C por 24h.

Após o cultivo, foram adicionadas 15 µL da solução reveladora de resazurina sódica a 0,01% e incubada por 2 h, para observar a alteração colorimétrica em caso positivo, mudando de azul para rosa. A CMI foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe parcialmente o crescimento do micro-organismo teste (CLSI, 2010).

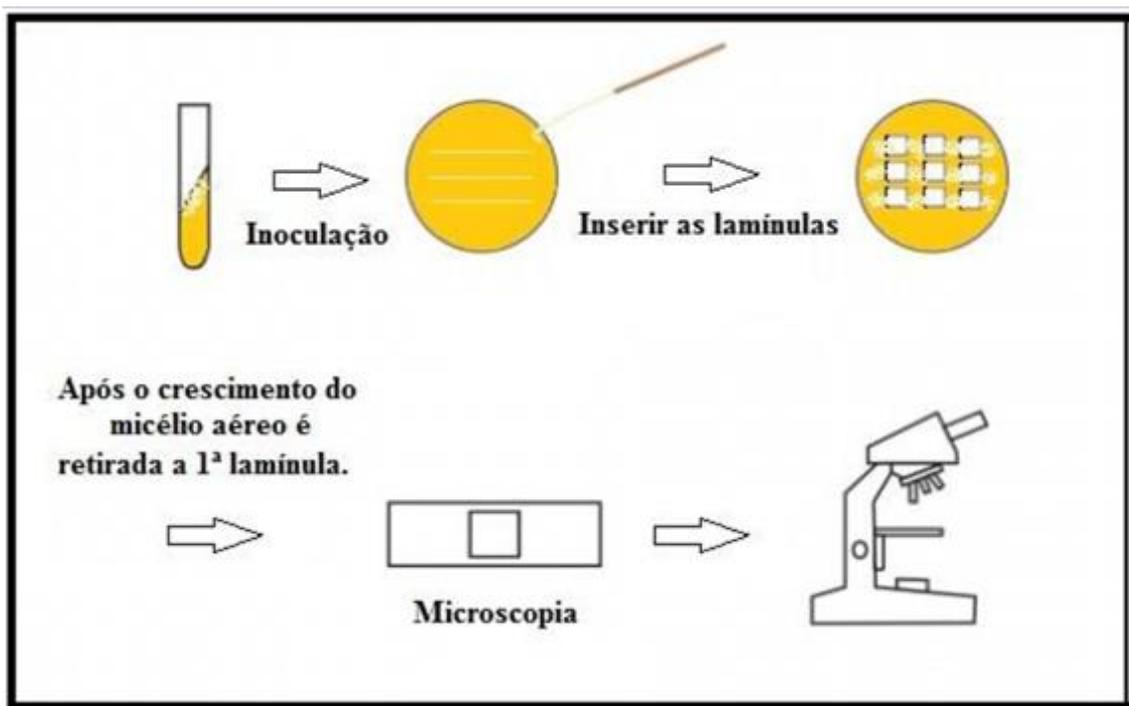
A Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi determinada pelo semeio dos poços azuis em placas de Petri contendo o meio Mueller Hinton sólido. As placas foram incubadas a 37° C por 24h e observada qual concentração não apresentou crescimento do micro-organismo teste.

4.8 Identificação das actinobactérias

4.8.1 Microcultivo

Para observação da micromorfologia, cada linhagem foi cultivada pela técnica de microcultivo em placa a 30 ou 37° C (figura 4.4), segundo técnica de Shirling e Gottlieb (1966), que consiste em inocular o micro-organismo em estrias nos meios de cultura sólido e, em seguida, inserir lamínulas com inclinação de 45° sobre a estria, de forma a induzir o crescimento do micélio aéreo sobre a lamínula para observação microscópica em objetiva de 40x.

Figura 4.4 - Técnica do microcultivo para identificação de actinobactérias.



4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), de acordo com o protocolo utilizado por Diniz et al. (2012) com algumas modificações. As amostras foram cultivadas em estrias largas como na técnica do microcultivo e inseridas lamínulas redondas compatíveis com os suportes metálicos – “stubbs”. Após crescimento do micélio aéreo, as lamínulas foram retiradas e submetidas à fixação em solução de glutaraldeído 2,5%, durante aproximadamente 2 h. Em seguida, lavadas três vezes com tampão cacodilato 0,1 M, por 10 min para retirada de todo o fixador e realizada a pós-fixação em ósmio 2% e tampão cacodilato 0,1 M por 1 h, na proporção 1:1, que vai permitir um maior contraste do material. Após lavagem em tampão cacodilato 0,1 M por duas vezes durante 10 min, e água destilada por duas vezes durante 10 min, foi iniciado o processo de desidratação em gradiente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 3x100% durante 15 min para cada gradiente). Após passar pelo aparelho de ponto crítico (BALTEC, CPD-030) para secagem das amostras por 1 h 30 min a 2 h e fixação em suporte metálico (stubbs) utilizando fita de carbono e tinta de prata, por 30min a 1h. Em seguida, as amostras

foram submetidas ao processo de metalização em ouro no aparelho LEICA, SCD-500 por 30 min. As observações e eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (QUANTA 200 FEG).

4.8.3 Identificação molecular através do sequenciamento do gene 16S RNA

4.8.3.1 Extração de DNA total

A extração de DNA foi realizada a partir do cultivo em meio líquido ISP-2 (Anexo L) por 18 a 20 horas a 37° C com agitação de 150 rpm, seguindo a metodologia de Sambrook et al. (1989). Alíquotas de cada cultura foram centrifugadas para obtenção da biomassa que foi tratada com 1,5 mL de tampão TAS (Anexo M) e centrifugada a 9168 \times g por 3 min. A biomassa foi novamente ressuspensa em 0,5 mL de TAS adicionado de 150 μ L de lisozima (10 mg.mL⁻¹) e colocadas em banho-maria a 37° C por 60 min. Em seguida, foram adicionados 400 μ L de clorofil (Anexo N) em cada amostra e os microtubos foram agitados e centrifugados a 9168 \times g por 3 min. Foi retirado aproximadamente 600 μ L do sobrenadante e transferidos para outros microtubos devidamente marcados. A cada sobrenadante foram adicionados 50 μ L de acetato de potássio (7,5 mol.L⁻¹, pH 5,2) e 600 μ L de isopropanol (P.A.) e em seguida as amostras foram colocadas no congelador por 2 horas para precipitação do DNA. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 6360 \times g e os sobrenadantes descartados. Foi adicionado 400 μ L de etanol (70%) aos pellets e centrifugados por 3 min a 9168 \times g. O sobrenadante foi descartado e após secagem do pellet foram adicionados 50-100 μ L de tampão TE (Anexo O) sendo posteriormente colocados em banho-maria por 60 min a 65° C.

A integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando 1 μ L de tampão de amostra, 1,5 μ L do syber e 3 μ L das amostras de DNA.

4.8.3.2 Reação de amplificação do DNA

As reações de amplificação e sequenciamento foram realizadas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em Jaguariúna-SP e Macrogen (Coréia).

A amplificação foi realizada por meio da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos universais para Eubacteria 27F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') e 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT-3') (HEUER; SMALA, 1997). A reação foi composta por um microlitro do DNA (em torno de 50 ng.mL⁻¹), 2 µL dNTPs (2,5 mM), 0,15 µL primer 27F (100mM), 0,15 µL primer 1492R (100mM), 1,5 µL da solução de MgCl₂ (50mM), 2,5 µL de tampão (Buffer 10X), 0,8 µL DMSO (P.A.), 0,35 µL Taq DNA Polymerase e 16,55 µL de água Milli-Q com volume final de 25 µL para a reação. As condições do termociclador foram desnaturação inicial 94° C por quatro minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94° C por um minuto, anelamento a 55° C por um minuto, extensão a 72° C por dois minutos e extensão final a 72° C por 10 minutos (KIM et al., 1996).

A amplificação do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,0%, utilizando 5 µL de tampão LB + gel red (4:1) e 4 µL das amostras de DNA amplificado.

4.6.3.3 Purificação do DNA e reações de sequenciamento

As amostras foram purificadas utilizando as enzimas: 'Exonuclease 1' (um microlitro) e 'Thermosensitive Alkaline Phosphatase' (um microlitro) para 5 µL do produto de PCR e assim foram colocadas no termociclador por 30 min a 37° C seguido por 15 minutos a 80° C para completar a purificação conforme instruções do fabricante.

Após a purificação, foram realizadas as reações de sequenciamento utilizando cinco primers listados na tabela 4.2. A reação obtinha 1 µL do DNA purificado, 0,08 µL de cada primer por reação, 3,5 µL de tampão 'save money', 1 µL de 'Big dye', 0,8 µL de DMSO e 13,62 µL de água Milli-Q com volume final de 20 µL.

Tabela 4.2 - Listagem dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento do gene 16S rRNA das actinobactérias da Caatinga.

| Primers | Sequências (5'-3') | Referências |
|----------|-----------------------------|----------------------|
| 27F | GAG TTT GAT CCT GGC TCA G | Heuer e Smala (1997) |
| Act-S20F | CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG | Stach et al. (2003) |
| 692F | AAT TCC TGG TGA GCG GT | - |
| Act-A19R | CCG TAC TCC CCA GGC GGG G | Stach et al. (2003) |
| 1492R | TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT | Heuer e Smala (1997) |

A precipitação do DNA foi realizada após as reações de sequenciamento pela adição de 2 µL de EDTA (125 mM), 2 µL de acetato de sódio (3 M) e 50 µL de etanol (P.A.) em cada amostra e cultivadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a 3000 \times g por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. Adicionou-se 70 µL de etanol 70% e novamente as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1800 \times g/ 4° C. As amostras foram secadas e adicionado 10 µL de formamida para serem submetidas ao sequenciador automático ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems).

4.8.3.4 Alinhamento e análise das sequências

As sequências obtidas do gene 16S rRNA das actinobactérias foram alinhadas utilizando os softwares Bioedit e Finch TV.

Após alinhamento, as sequências foram comparadas com todas as sequências no Genbank, utilizando o software Blast do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) e também foi utilizado o EzTaxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) (KIM et al., 2012) para avaliar a similaridade com outras sequências conhecidas além disto arquivar todos os dados obtidos como número de pares de bases, similaridade, entre outros.

A construção da árvore foi realizada utilizando o MEGA 5.0 software (TAMURA et al., 2011), após alinhamento com o Clustal W, e a árvore foi avaliada pelo método de 'Neighbor-Joining' (SAITOU; NEI, 1987), modelo Jukes e Cantor (1969) e análise de bootstrap com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985). Foram utilizados dois anti-grupos: *Nocardia* sp. e *Bacillus* sp. para observar o distanciamento filogenético em relação às actinobactérias da Caatinga.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Isolamento de actinobactérias

Foi observado pH 7,2 na amostra do solo rizosférico e que segundo Goodfellow e Williams (1983), a grande maioria das espécies de actinobactérias cresce geralmente em pH próximo à neutralidade, fato este mostrado pelo isolamento de 96 linhagens de actinobactérias da rizosfera da planta Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.), nativa da Caatinga.

Dos 96 isolados, 78% (75) foram provenientes da diluição 10^{-3} , 19% (18) provenientes da diluição 10^{-4} e 3% (3) da diluição 10^{-5} . Silva (2013) utilizando diferentes condições de temperatura (37°C e 45°C) e nutrientes (meios MC, AYm, ISP-4) também encontrou resultados semelhantes em seu isolamento realizado da rizosfera da mesma planta utilizada no presente estudo, apontando que a diluição 10^{-3} permite um maior número de isolados. Vasconcelos et al. (2010) realizaram isolamento a partir da rizosfera de *Araucaria angustifolia* e salientaram a diluição de 10^{-3} como uma das mais adequadas para o isolamento, embora o número de contaminantes seja maior quando comparado as outras diluições. A dificuldade para a purificação pode ser contornada pelo uso de antibiótico e antifúngico seguido de plaqueamento em diferentes meios de cultura.

Os resultados mostram a grande importância da utilização de diferentes meios de cultura no isolamento, que pode indicar a grande diversidade de actinobactérias em diferentes habitats. Neste isolamento, o meio HV-ágar se destacou como o melhor meio de cultura para o isolamento de actinobactérias da rizosfera da Caatinga, mostrando que 46% (44) das actinobactérias isoladas foram provenientes deste meio de cultura. A grande diversidade dessas bactérias filamentosas pode ser constatada pela produção de pigmentos de várias tonalidades, como: roxo, vermelho, cinza, rosa, vinho, azul, verde, marrom, como pode ser observado na figura 5.1 e Apêndice B. Menor percentual de isolamento foi observado nos meios: HT-ágar (24%), ALA (16%) e MC-ágar (15%), figura 5.2.

Figura 5.1 - Diversidade macroscópica de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. A: Micélio aéreo. B: Reverso.

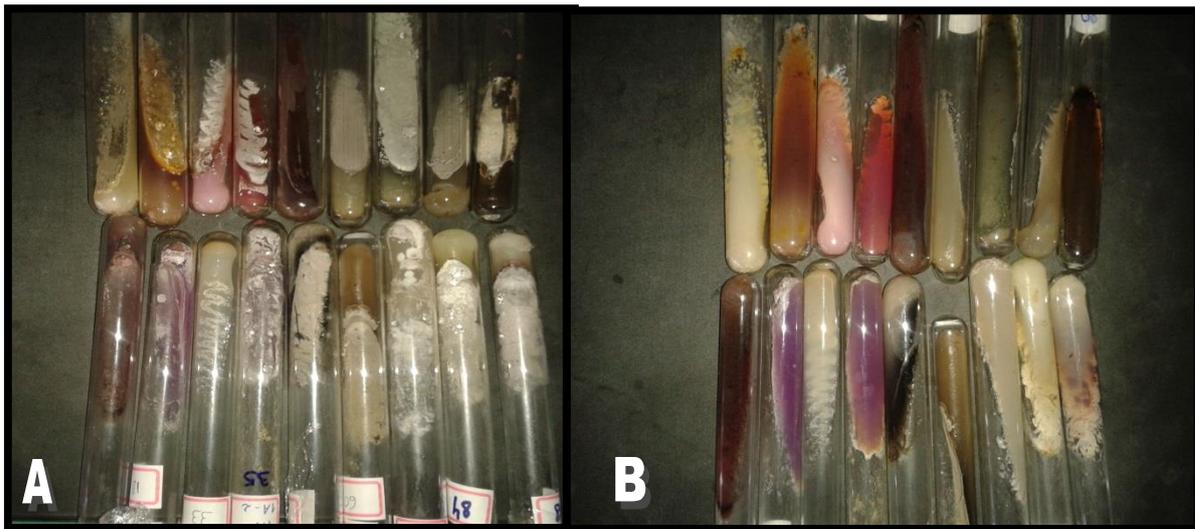
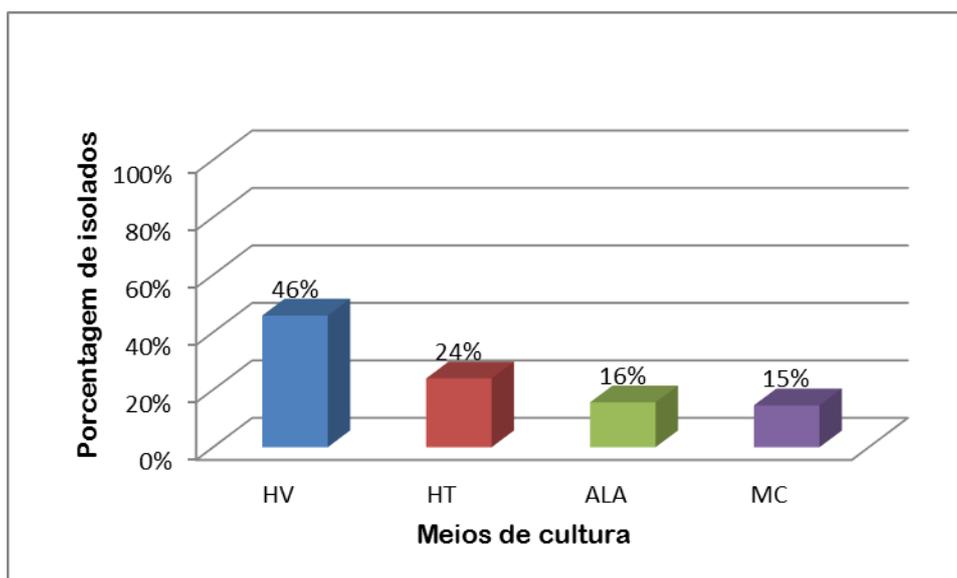


Figura 5.2 – Porcentagem de isolados em diferentes meios de cultura.



Hayakawa e Nonomura (1987) relataram que o meio HV-ágar que contém ácido húmico do solo como fonte de carbono e nitrogênio pode proporcionar uma maior ocorrência de colônias de actinobactérias de gêneros distintos do que outros meios de cultura utilizados em decorrência da ativação dos esporos germinativos. No meio HV-ágar, foi verificado ainda a ocorrência de actinobactérias de crescimento lento, comprovando a importância deste meio de cultura para o isolamento de actinobactérias.

Estas actinobactérias de crescimento lento são mais difíceis de serem isoladas

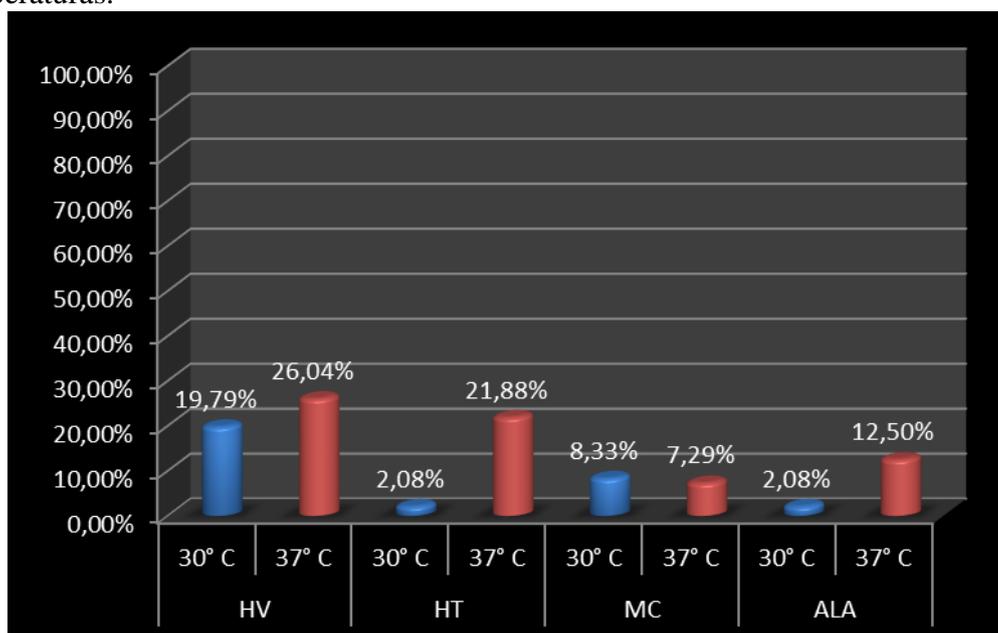
em decorrência da competição com outros micro-organismos que podem levar à contaminação. O meio HV-ágar promove um crescimento mais seletivo de actinobactérias e presença de menos contaminantes em relação aos demais meios de cultura utilizados neste trabalho.

Zhao et al. (2009) isolaram 239 actinobactérias de sedimentos marinhos da China, utilizando quinze meios seletivos, entre eles o meio HV-ágar onde foram isoladas 239 colônias de actinobactérias, sendo que 102 eram provenientes desse meio de cultura, indicando o grande potencial destas condições para isolamento deste grupo de bactérias filamentosas.

Os resultados mostram também que na temperatura de 37° C foi observada maior ocorrência de actinobactérias 68% (65), enquanto que a 30° C obteve um número menor de isolados, 32% (31).

Comparando as duas temperaturas de isolamento (30° C e 37° C) nos diferentes meios de cultura utilizados, foi possível observar que a maioria das actinobactérias foi isolada a 37° C, exceto no meio MC em que a 30° C o percentual de isolamento foi 8,33% e a 37° C de 7,29% com uma diferença de 12,5% que é insignificante em relação ao observado nos outros meios (figura 5.3). No meio HV-ágar, foram isoladas maior quantidade de actinobactérias 26,04% (25) a 37° C, enquanto na temperatura de 30° C foram isolados apenas 19,79% (19) Estes resultados mostram a importância da temperatura utilizada durante o isolamento.

Figura 5.3 – Porcentagem de actinobactérias isoladas em diferentes meios de cultura e temperaturas.



5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

5.2.1 Ensaio primário em meio sólido

A atividade antimicrobiana no ensaio em “bloco de gelose” para os oito micro-organismos selecionados (Gram positivos, Gram negativos, fungos filamentosos e leveduriforme), mostrou que das 96 linhagens de actinobactérias testadas, 55,21% (53) apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos micro-organismos testados (Apêndice C).

Os resultados apresentados na figura 5.4 mostram que das 53 actinobactérias que apresentaram atividade antimicrobiana, 70% (37) apresentaram atividade contra alguma ou mais de uma das bactérias Gram positivas testadas (*B. subtilis*, *S. aureus* e MRSA); e apenas 13% (7) das actinobactérias inibiram bactérias Gram negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*); enquanto 19% (10) mostraram atividade para levedura (*C. albicans*) e 40% (21) com atividade contra os fungos filamentosos (*A. niger* e *F. oxysporum*). Esta menor atividade antimicrobiana para as bactérias Gram negativas é decorrente da natureza complexa de sua parede celular, que possui uma membrana externa ao seu redor conferindo maior resistência à ação de antibióticos os quais não são capazes de atravessar a barreira lipídica (MADIGAN, 2010).

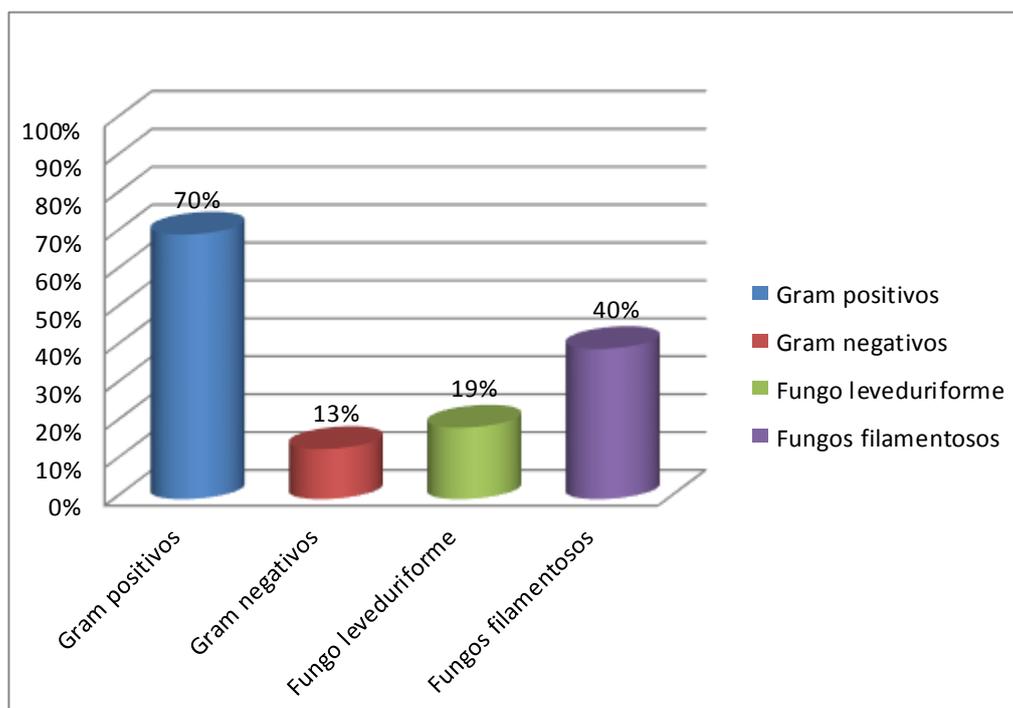
Várias pesquisas realizadas com amostras do solo de diversos ambientes mostram o grande percentual das actinobactérias com atividade antimicrobiana, como relatado por Azuma (2011) que isolou 116 actinobactérias das quais 72% (84) apresentaram atividade contra duas ou mais cepas patogênicas no ensaio antimicrobiano. Melo (2009) também verificou que dos 60 isolados de actinobactérias, 68% (41) apresentaram atividade contra pelo menos um dos micro-organismos testados (*Pythium aphanidermatum*, *Fusarium moniliforme*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*). Igualmente, Hozzein (2011) realizou isolamento de actinobactérias do deserto egípcio, e observou que dos 75 isolados, 42,67% (32) apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* metilina resistente (MRSA), *Escherichia coli*, *Mycobacterium pheli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella* spp., *Candida albicans* and *Candida kruzei*.

Igualmente, Thakur et al. (2007) também isolaram 110 actinobactérias do solo de áreas de florestas da Índia, as quais foram testadas para *Staphylococcus aureus*,

Bacillus subtilis, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus niger*, e observado que 59% (65) apresentaram atividade antibacteriana, 42,72% (47) mostraram atividade antifúngica e 30% (33) exibiram um largo espectro de atividade contra bactérias e fungos, o que demonstrou a grande diversidade de actinobactérias com largo espectro de atividade antimicrobiana.

Muitos trabalhos relatam o grande potencial antimicrobiano das actinobactérias que são reconhecidas cientificamente como os principais micro-organismos produtores de antibióticos antibacterianos, antifúngicos, antivirais etc.

Figura 5.4 – Porcentagem das actinobactérias com atividade antimicrobiana para diferentes grupos de micro-organismos.



5.2.2 Análises estatísticas

Para avaliar se houve diferenças entre as médias dos resultados da atividade antimicrobiana, foi realizado o teste ANOVA de fator único no programa Excel e programa Minitab. Foi observado que as médias dos resultados obtidos foram

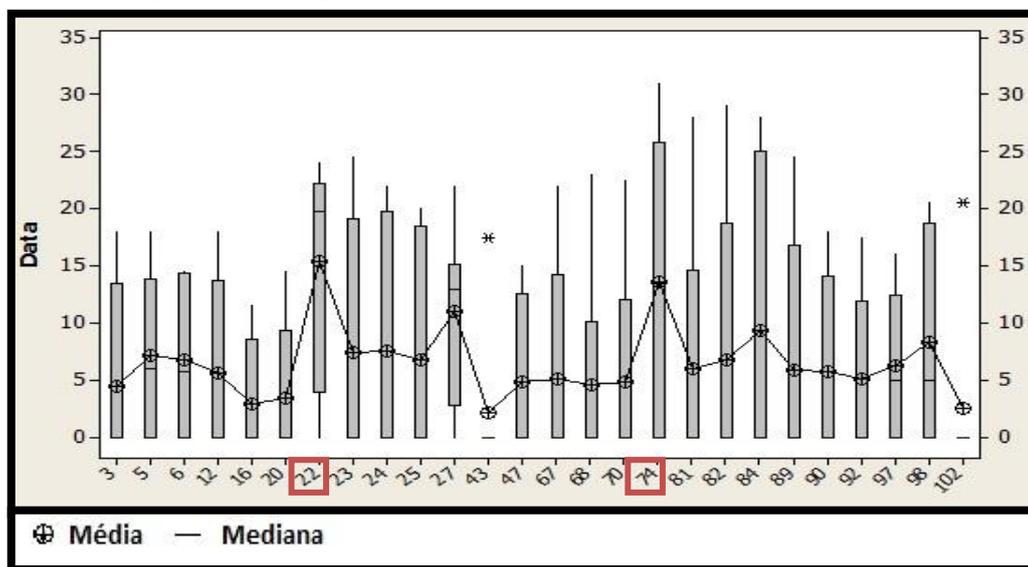
estatisticamente diferentes, ou seja, as linhagens apresentaram halos de inibição com atividade antimicrobiana diferente.

A análise de variância evidenciou que o F calculado (2,59) das amostras foi maior que o F crítico além do valor- p ($<0,05$) demonstrando que existem diferenças significativas entre as médias observadas na atividade antimicrobiana.

A análise estatística apresentada na figura 5.5 mostra que as actinobactérias 22 (ALA 1A+8) e 74 (HT 1A+17) se destacaram quanto à atividade antimicrobiana uma vez que os valores dos testes estão mais próximos da média geral calculada, que foi confirmado pela realização de teste estatístico de Tukey ($p < 0,05$) para definir as melhores médias.

O teste de Tukey mostrou que as médias dos resultados das linhagens apresentaram diferenças estatísticas, entretanto, comparando as duas linhagens 22 (ALA 1A+8) e 74 (HT 1A+17) não foram observadas diferenças significativas entre elas. A actinobactéria 74 (HT 1A+17) foi então selecionada por apresentar melhor esporulação e, conseqüentemente, crescer mais rapidamente.

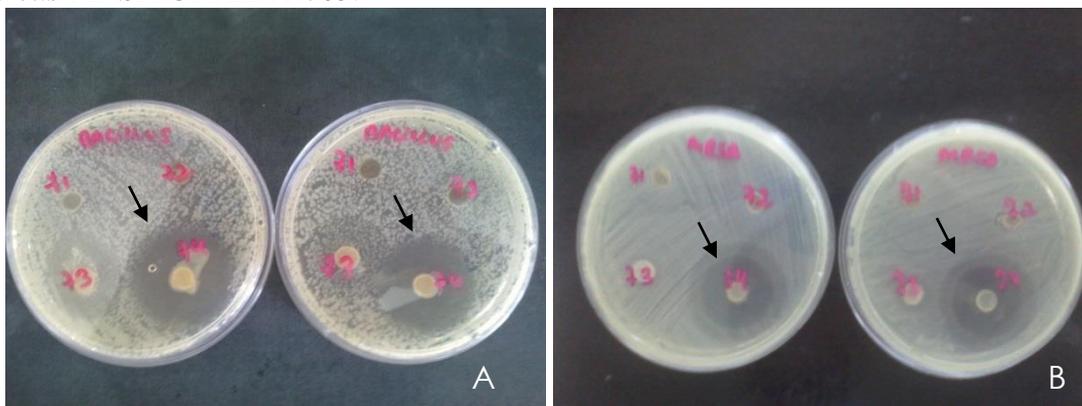
Figura 5.5 – Análise estatística dos dados obtidos dos testes de atividade antimicrobiana por bloco de gelose.



Das actinobactérias que apresentaram atividade antimicrobiana, a linhagem 74 (HT 1A+17) apresentou ótimos halos de inibição contra as bactérias Gram-positivas:

Bacillus subtilis UFPEDA-86 (31 mm), *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02 (27 mm) e MRSA UFPEDA-705 (24 mm), como podem ser observados na figura 5.6.

Figura 5.6 – Atividade antimicrobiana de bloco de gelose da actinobactéria 74 (HT 1A+17) isolada da Caatinga. (A) *Bacillus subtilis* UFPEDA-86. (B) *Staphylococcus aureus* MRSA UFPEDA-705.



5.2.3 Ensaio secundário

No ensaio secundário, o isolado 74 (HT 1A+17) mostrou produção de composto(s) bioativo(s) durante o processo fermentativo. Este isolado apresentou uma melhor produção do composto bioativo no meio MPE com 72 horas de fermentação, com halos de inibição de 20 mm para *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, 21 mm para *S. aureus* metilina resistente (MRSA). O pH ao final da fermentação foi igual a 8,0, no meio MPE que apresentou também maior produção de biomassa correspondendo a 13,45 mg de peso seco, como podem ser observados nos Apêndices D, E e F.

Cunha et al. (2009) também selecionaram esse tempo como o de melhor produção de metabólitos bioativos por fermentação do *Streptomyces* endófito isolado das raízes da planta *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist coletadas no município de Igarassu- PE, Brasil, porém selecionou o ISP2 como melhor meio de produção, seguido do meio MPE.

5.3 Obtenção do extrato bruto – Biomassa e Líquido metabólico

A extração do metabólito bioativo da actinobactéria 74 (HT 1A+17) foi realizada utilizando o meio MPE, com 72 horas de fermentação, conforme verificado no ensaio secundário como as melhores características de produção.

Os solventes etanol, metanol e acetona foram testados para extração do composto bioativo da biomassa e apresentaram os melhores halos com o solvente acetona em pH 7. Já os solventes hexano, acetato de etila e clorofórmio foram testados para tentativa de extração do líquido metabólico (tabela 5.1). O hexano, pH 7,0, apresentou o melhor resultado. Comprovando a presença do princípio bioativo tanto na biomassa quanto no líquido metabólico.

Tabela 5.1 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto da biomassa e do líquido metabólico do isolado 74 (HT 1A+17) testado frente a *Staphylococcus aureus*.

| Extrato | | pH | | |
|--------------------|------------------|------|----|----|
| | | 2 | 7 | 9 |
| Biomassa | Etanol | 12 | 15 | 14 |
| | Metanol | 15 | 16 | 16 |
| | Acetona | 16 | 17 | 16 |
| Líquido Metabólico | Hexano | 16 | 18 | 0 |
| | Acetato de etila | 12 | 12 | 11 |
| | Clorofórmio | 16,5 | 9 | 0 |

Média aritmética dos halos de inibição (milímetros).

O líquido metabólico original (o produto da fermentação, utilizado como controle positivo) apresentou halo de 16 mm. O líquido metabólico esgotado (a fase aquosa após tratamento do líquido metabólico com os solventes) não apresentou atividade, indicando que a extração foi eficiente com os solventes utilizados. Não houve crescimento no controle do solvente.

Reddy (2011) também utilizou acetona para extração do metabólito bioativo da biomassa de uma linhagem de *Streptomyces hyderabadensis* isolado do solo da Índia. Silva (2013) também usou este mesmo solvente para extrair o composto da biomassa de *Streptomyces gougerotti*, afirmando que o potencial hidrogeniônico para extração do metabólito bioativo é importante para determinar se o antibiótico tem caráter ácido,

básico ou neutro e também observou que o pH 7,0 foi o mais indicado para extração do composto bioativo do fermentado de *S. gougerotti*.

5.4 Atividade antimicrobiana dos extratos

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto da biomassa e do extrato bruto hexânico do líquido metabólico da actinobactéria 74 (HT 1A+17) foram realizadas através da Concentração Mínima Inibitória (CMI) desses compostos frente a bactérias Gram positivas.

Os micro-organismos teste selecionados para a CMI foram aqueles que apresentaram susceptíveis ao teste de atividade antimicrobiana: *B. subtilis* (UFPEDA-86); *S. aureus* (UFPEDA-02) e *S. aureus* metilicina resistente (MRSA) (UFPEDA-705).

O extrato bruto acetônico da biomassa apresentou CMI de 61,5 µg/mL para *B. subtilis* UFPEDA-86 e 245 µg/mL para ambos *S. aureus* UFPEDA-02 e MRSA UFPEDA-705. Já o extrato bruto hexânico do líquido metabólico, apresentou CMI de 50 µg/mL para *B. subtilis* UFPEDA-86 e 200 µg/mL para *S. aureus* UFPEDA-02 e MRSA UFPEDA-705, conforme descrito na tabela 5.2. Nesta mesma tabela também pode ser observada a CMB (concentração mínima bactericida) de *B. subtilis* que foi 122,5 µg/mL para o extrato bruto da biomassa e de 100 µg/mL para o extrato bruto do líquido metabólico.

Tabela 5.2 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto da biomassa e do líquido metabólico do isolado 74 (HT 1A+17).

| Micro-organismo teste | Extrato bruto acetônico da Biomassa (µg/mL) | | Extrato bruto hexânico do Líquido Metabólico (µg/mL) | |
|---------------------------------------|---|-------|--|-----|
| | CMI | CMB | CMI | CMB |
| <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA-86 | 61,5 | 122,5 | 50 | 100 |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA-02 | 245 | 490 | 200 | 400 |
| MRSA UFPEDA-705 | 245 | 490 | 200 | 400 |

Outros autores também testaram a atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Streptomyces* isolados de solo de várias regiões com atividade contra as bactérias Gram positivas. Arasu e colaboradores (2008) verificaram atividade antimicrobiana de *Streptomyces* spp. ERI-26 isolada do solo rochoso da floresta do Ghats Ocidental, em Tamil Nadu, na Índia e obtiveram CMI de 1500 µg/mL para *B. subtilis* e *S. aureus* a partir de uma das frações do extrato bruto metanólico. Enquanto, Arasu e colaboradores (2009) observaram CMI de 250 µg/mL para *S. aureus* do extrato bruto de acetato de etila de *Streptomyces* spp. ERI-3 isolada da mesma região. Choi et al. (2012) observaram CMI de 250 µg/mL para *B. subtilis*, 125 µg/mL para *S. aureus* e 500 µg/mL para *MRSA* do extrato bruto de acetato de etila do isolado de *Streptomyces* sp. BCNU 1001 do solo de floresta das montanhas de Gyebang na província de Gangwon, Coréia. Desta forma, os valores de CMI dos extratos obtidos no nosso trabalho se apresentam como promissores mesmo ainda sendo extratos brutos, havendo a necessidade de purificação e identificação do composto para melhores resultados.

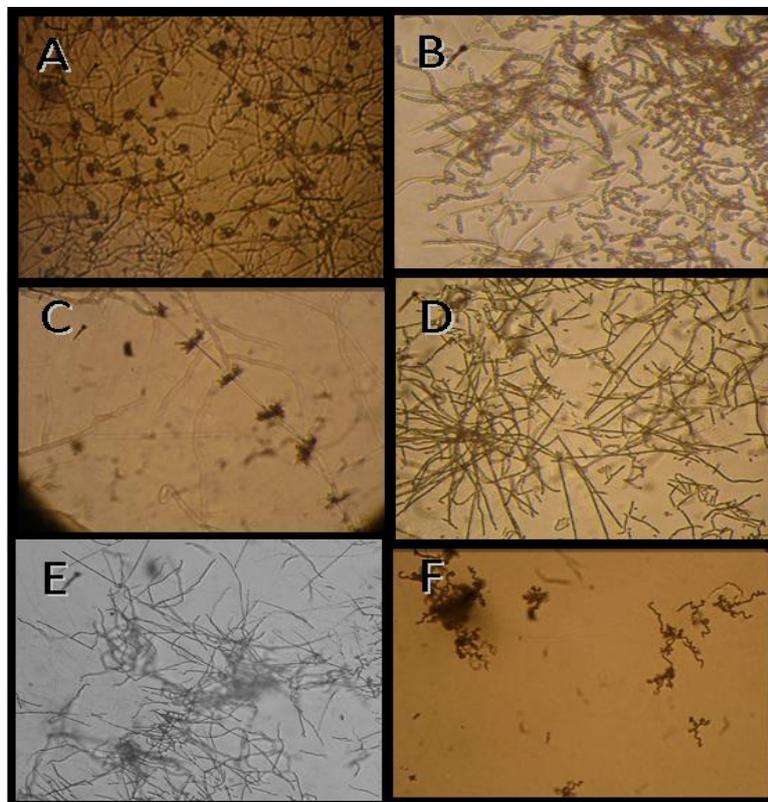
5.5 Identificação das actinobactérias

5.5.1 Microcultivo

As actinobactérias foram visualizadas pela técnica do microcultivo. Foi utilizado o melhor meio para esporulação das actinobactérias, permitindo assim a diferenciação das cadeias de esporos ao microscópio óptico (figura 5.7).

Das 96 linhagens isoladas, foram realizados microcultivos de 49% (47) das actinobactérias e por meio de microscopia óptica foi evidenciado que 47% (22) pertencem ao gênero *Streptomyces*, pois foram observados esporos espiralados, 32% (15) apresentaram uma morfologia nocardioforme, sendo visualizadas hifas longas com esporos ao longo de toda a hifa, indicando que não são *Streptomyces*, 19% (9) apresentaram semelhança entre os gêneros *Streptomyces* e *Actinomadura*, por exibirem esporos curtos ao longo da hifa e necessitam de mais testes para diferenciação, como a caracterização de parede celular e 2% (1) não puderam ser bem diferenciados por esta técnica.

Figura 5.7 – Visualização através de microscopia óptica do microcultivo de actinobactérias isoladas da Caatinga. Isolados: A: *Streptomyces* sp.-02; B: Não identificado-03; C: *Streptomyces* sp.-25; D: *Kitasatospora* sp.-64; E: Não identificado - 61; F: *Streptomyces* sp-70.



A maioria dos isolados foi identificada como pertencentes ao gênero *Streptomyces*, isso pode ser explicado por ser um micro-organismo de crescimento rápido, que esporula facilmente e não apresenta muitas exigências nutricionais. A predominância deste gênero tem sido relatada em diversos trabalhos (VIJAYAKUMAR et al., 2007; CEYLAN, OKMEN, UGUR, 2008; VELHO-PEREIRAA E KAMT, 2012).

Na identificação das actinobactérias é importante levar em consideração diferentes características dessas bactérias filamentosas, o que implica na utilização de várias técnicas diferentes para esse fim. Em relação à morfologia deve-se observar a cor do micélio aéreo e o tipo de esporo. Para tanto é importante utilizar um meio de cultura que possibilite uma boa esporulação e diferenciação da cor do micélio aéreo (LECHEVALIER, 1989).

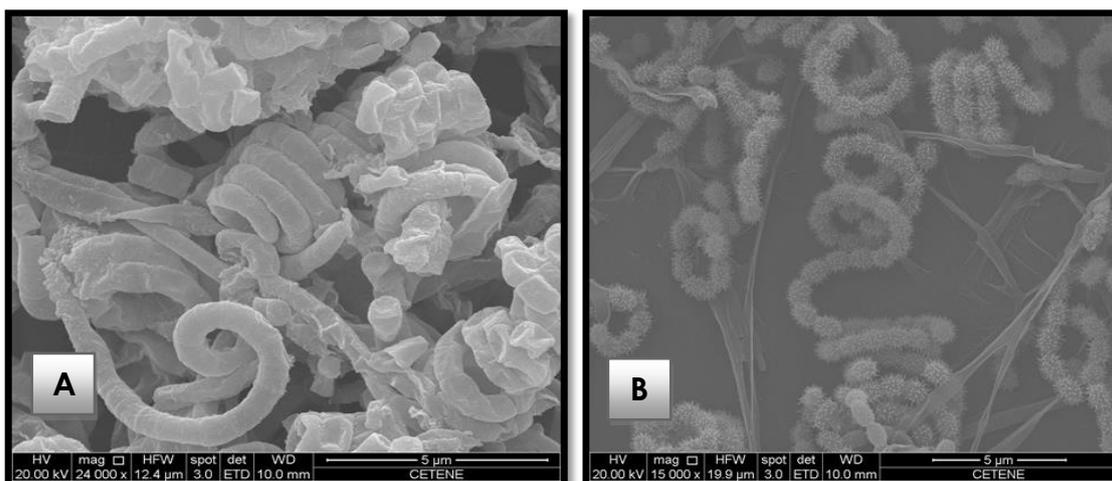
Azuma (2011) obteve 116 actinobactérias do isolamento da região entre-marés e as identificou como pertencentes aos gêneros *Nocardia* sp. e *Streptomyces* sp., este último é o gênero de maior ocorrência na nossa pesquisa.

Lins (2012), realizando o isolamento de actinobactérias da rizosfera da Caatinga, também observou alta ocorrência dos gêneros *Nocardiopsis* spp. e *Streptomyces* spp., além dos gêneros *Actinomadura* spp. e *Streptosporangium* spp.

Os resultados obtidos na microscopia eletrônica de varredura corroboram a visualização por microscopia óptica.

Na figura 5.8, podemos observar cadeias de esporos espiraladas das actinobactérias 12 e 02, identificadas como do gênero *Streptomyces* sp.

Figura 5.8 – Visualização através de microscopia eletrônica de varredura do microcultivo de actinobactérias isoladas da Caatinga. Isolados: A: *Streptomyces* sp.-12; B: *Streptomyces* sp.-02.



5.5.2 Análise molecular

A análise da sequência 16S rRNA dos isolados, mostraram identificação parcial de 18,75% (18) das actinobactérias como descritos na tabela 5.3.

A região 16S rRNA tem aproximadamente 1500 pb e a amplificação desta região do DNA é fundamental para identificação de bactérias e actinobactérias (VOLOKHOV et al., 2012). Das actinobactérias identificadas, foram encontrados os possíveis gêneros *Amycolatopsis* sp., *Streptomyces* sp., *Kitasatospora* sp. e *Kribella* sp.

Tabela 5.3 – Identificação parcial das actinobactérias através do sequenciamento do gene 16S RNA.

| Isolado | Comprimento (bp) | Identificação Molecular | Similaridade (%) | Acesso no Genbank |
|---------|------------------|--|------------------|-------------------|
| 65 | 1150 | <i>Streptomyces violaceochromogenes</i> IFO 13100(T) | 97.50 | AY999867 |
| 08 | 1104 | <i>Kribbella swartbergensis</i> DSM 17345(T) | 99.33 | FN643223 |
| 74 | 1008 | <i>Streptomyces noursei</i> NBRC 15452(T) | 98.25 | AB184678 |
| 06 | 1003 | <i>Amycolatopsis niigatensis</i> LC11(T) | 99.70 | AB248537 |
| 79 | 1000 | <i>Streptomyces griseorubiginosus</i> LMG 19941(T) | 97.71 | AJ781339 |
| 78 | 998 | <i>Streptomyces tricolor</i> LMG 20328(T) | 98.65 | AJ781380 |
| 26 | 975 | <i>Amycolatopsis saalfeldensis</i> HKI0457(T) | 97.99 | DQ792500 |
| 12 | 901 | <i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178(T) | 96.21 | AB184737 |
| 11 | 822 | <i>Streptomyces globisporus</i> NRRL B-2293(T) | 99.51 | DQ026634 |
| 64 | 785 | <i>Kitasatospora paranesis</i> HKI 0190(T) | 99.61 | AY442268 |
| 54 | 783 | <i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 41919(T) | 99.36 | FM202482 |
| 94 | 773 | <i>Streptomyces antibioticus</i> NBRC 12838(T) | 91.05 | AB184184 |
| 29 | 755 | <i>Streptomyces antibioticus</i> NBRC 12838(T) | 98.77 | AB184184 |
| 27 | 752 | <i>Amycolatopsis saalfeldensis</i> HKI0457(T) | 97.40 | DQ792500 |
| 96 | 560 | <i>Streptomyces minutiscleroticus</i> NBRC 13000(T) | 96.54 | AB184249 |
| 95 | 522 | <i>Streptomyces fragilis</i> NRRL 2424(T) | 91.65 | AY999917 |
| 03 | 498 | <i>Streptomyces cellostaticus</i> NBRC 12849(T) | 98.56 | AB184192 |
| 93 | 316 | <i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 41919(T) | 84.35 | FM202482 |

Zhao et al. (2011) também conseguiram uma boa diversidade de actinobactérias a partir do isolamento de 560 actinobactérias de 26 espécies de plantas medicinais, das quais 74 das linhagens endofíticas foram selecionadas para identificação molecular e obtiveram, através da análise filogenética, 7 isolados de *Streptomyces* spp., enquanto que o restante pertencia aos gêneros *Micromonospora*, *Oerskovia*, *Nonomuraea*, *Promicromonospora* e *Rhodococcus*.

Zhang et al. (2014) investigando actinobactérias de sedimentos marinhos do ártico, isolou 152 linhagens das quais 18 isolados foram selecionados para análise filogenética e os resultados mostraram 10 gêneros conhecidos, incluindo: *Actinotalea*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Kocuria*, *Kytococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* e *Pseudonocardia*.

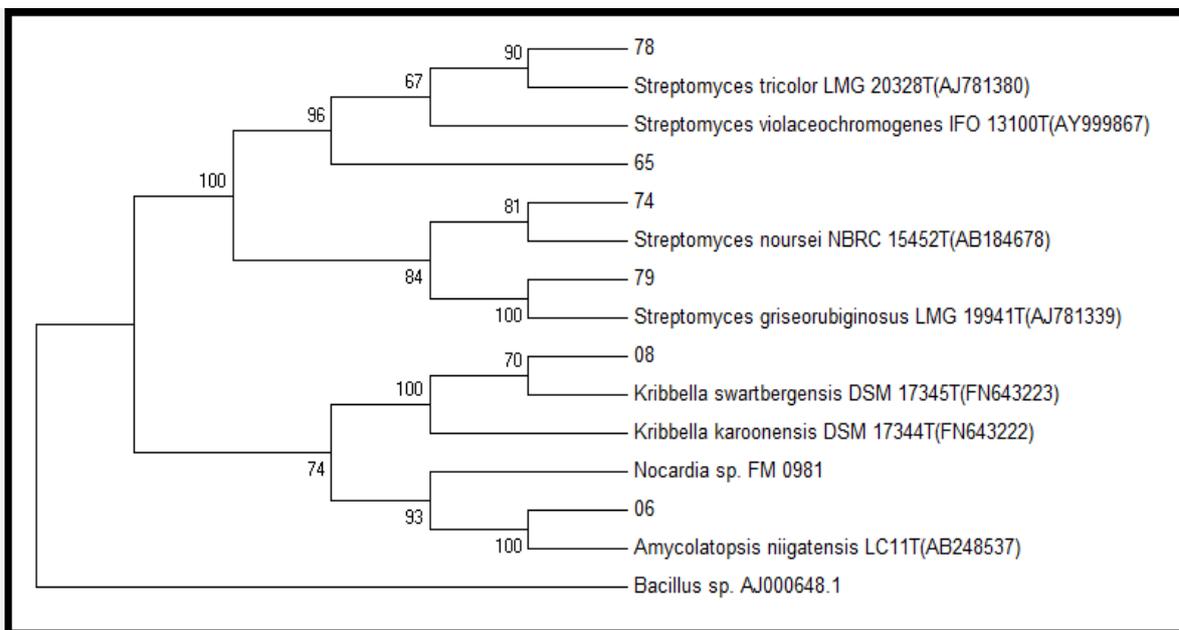
Dentre os gêneros identificados, *Kribbella* sp. é considerada uma actinobactéria rara sendo pouco encontrada na literatura, foi primeiro descrita por Park et al. (1999) e inclui 6 espécies que formam um grupo homogêneo dentro da família Nocardioideae (TRUJILLO, 2006).

O isolado 74 (HT 1A+17) utilizado no presente trabalho para extração do composto bioativo apresentou alta similaridade de 98% para *Streptomyces noursei*.

Krishnaveni e colaboradores (2010) também relataram atividade antimicrobiana de um isolado do solo da Índia identificado como *Streptomyces noursei* contra bactérias Gram positivas e cepas clínicas resistentes de *Staphylococcus*.

A partir dos dados obtidos, foi realizada árvore filogenética dos micro-organismos com aproximadamente 1000 pares de base correlacionando as linhagens identificadas pelo gene 16S rRNA com linhagens mais próximas na similaridade e construída uma árvore filogenética (figura 5.4) com o micro-organismo mais próximo reportado no EzTaxon. Foram utilizados também um gênero de *Nocardia* sp. e um de *Bacillus* sp. para observar o distanciamento filogenético.

Figura 5.9 - Árvore filogenética ‘*Neighbor-Joining*’ referente às sequências do gene 16S RNA mostrando as posições das linhagens isoladas da rizosfera da Caatinga em relação a actinobactérias mais próximas depositadas no GenBank. *Nocardia* sp. e *Bacillus* sp. foram incluídas para observar distanciamento filogenético.



6. CONCLUSÕES

- Foram isoladas 96 actinobactérias de amostra de amostra de solo rizosférico da Caatinga, das quais 55% (53) apresentaram atividade antimicrobiana.
- O meio HV-ágar permitiu o isolamento de 46% (44) das actinobactérias, com grande diversidade.
- A actinobactéria 74 (HT 1A+17) identificada como *Streptomyces* sp. apresentou ampla atividade antimicrobiana para bactérias Gram positivas.
- O meio MPE com 72 horas de fermentação apresentou as melhores condições de produção do antibiótico.
- *Streptomyces* sp. 74 (HT 1A+17) produz compostos bioativos na biomassa e no líquido metabólico.
- O composto bioativo da biomassa foi extraído com acetona e o líquido metabólico com hexano.
- Pela técnica do microcultivo, 23% (22) das actinobactérias foram identificadas a nível de gênero e, por técnicas moleculares, 18,75% (18) apresentaram alta similaridade a nível de espécie com outras actinobactérias.

7. PERSPECTIVAS

- Caracterizar quimicamente os compostos bioativos produzidos pelo *Streptomyces* sp. 74 (HT 1A+17);
- Realizar testes bioquímicos das linhagens de actinobactérias para melhor identificação dos isolados a nível de espécie;
- Proceder com a identificação molecular das demais actinobactérias isoladas.

8. REFERÊNCIAS

- ANTONIO, N. S.; OLIVEIRA, A. C.; CANESINI, R.; ROCHA, J. R.; PEREIRA, R. E. P. Mecanismos de Resistência Bacteriana. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano VII; N12; jan: 2009. ISSN:1679-7353.
- ARASU, M. V.; DURAIANDIYAN, V.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. **Journal de Mycologie Médicale**, 18(3), p. 147–153. 2008.
- ARASU, M. V.; DURAIANDIYAN, V.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale**, v. 19, p. 22-28, 2009.
- AZUMA, M. V. P. Actinobactérias com potencial biotecnológico Isoladas da região entre-marés da ilha do mel. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493–496, 1966.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1–26. 2005.
- BERNARDO, G. R. B. “Atividade antifúngica de actinobactérias da rizosfera de *Terminalia fagifolia* (Bioma Caatinga) ativas contra *Candida* spp.” Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- BLUMAN, A. G. "**Elementary Statistics: A Step by Step Approach**". 4th ed. chapter 13. 2001.
- BRAGA, R. Plantas do nordeste: especialmente do Ceará. Natal: Fundação Guimarães Duque, 1976. 509p. (Coleção Mossoroense, 42)

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Agroecologia na Borborema. Cartilha: Plantar árvores para colher frutos. Disponível em: <<http://aspta.org.br/wp-content/uploads/2011/11/Cartilha-Plantar-%C3%A1rvores-para-colher-o-futuro.pdf>>. Acesso em: 03 set. 2013.

BULL, A. T.; STARCH, J. E. M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. **Trends. Microbiology**, v. 15, p. 491-499. 2007.

CANOVA, S. P. Diversidade e bioprospecção de actinobactérias isoladas de manguezais. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CARDOSO, E. J. B. N. & FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. & NEVES, M. C. P., eds. **Microbiologia do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.41-57. 1992.

CEYLAN, O.; OKMEN, G.; UGUR, A. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **EurAsian Journal of BioSciences**. v. 2, p. 73-82, 2008.

CHOI, H. J.; KIM, D. W.; CHOI, Y. W.; LEE, Y. G.; LEE, Y.; JEONG, Y. K.; JOO, W. H. Broad-spectrum In Vitro Antimicrobial Activities of *Streptomyces* sp. Strain BCNU 100. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 17, p. 576-583, 2012.

(CLSI) Clinical and laboratory standards institute. **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing**. Twentieth informational supplement: M100-S20 e M100-S20-U. Wayne (PA): CLSI, 2010.

CUNHA, I. G. B.; SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, R. E. A.; AMORIM, E. L. C.; ARAUJO, J. M. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 120 – 123, 2009.

DIAS, M.; MONTEIRO, M. S. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Clínica Farmacológica**. Cadernos Otorrinolaringologia. Clínica, investigação e inovação. 2010.

DINIZ, P. F. A.; OLIVEIRA, L. E. M.; LOPES, N. A.; FLORENTINO, L. A., CARVALHO, T. S.; MOREIRA, F. M. S. “Bactérias Diazotróficas Em Solos Sob Seringueira.” **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1426–1433, 2012.

EL-NAGGAR, M. Y.; EL-ASSAR, S. A.; ABDUL-GAWAD, S. M. Meroparamycin Production by Newly Isolated *Streptomyces* sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation, Purification and Structural Elucidation. **The Journal of Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 432-438, 2006.

(EMBRAPA) Empresa brasileira de Pesquisas e Agropecuária. **Ecologia da rizosfera e Filosfera**. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php3?id=228&func=unid>> Acesso em: 9 de agosto de 2012.

FELSENSTEIN, J. "Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap." **Evolution**, 39:783–791. 1985.

FERREIRA, C. Descoberta metagenômica da dinâmica do microbioma da rizosfera de Mandacaru na Caatinga. Biblioteca Virtual. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/131539/descoberta-metagenomica-dinamica-microbioma-rizosfera/>>. Acesso em: 04 nov. 2012.

FLARDH, K.; BUTTER, M. J. *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, Madison, v. 7, p. 36-49, 2009.

GIULIETTI, A. M. et al. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. In: J.M.C. Silva, M. Tabarelli, M.T. Fonseca & L.V. Lins (orgs.). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. pp. 48-90. Ministério do Meio Ambiente, Brasília: 2004.

GONZALEZ, I.; AYUSO-SACIDO, A.; ANDERSON, A.; GENILLOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.401-415, 2005.

GOODFELLOW, M. M.; WILLAMS, S. T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 189-216, 1983.

HAYAKAWA, M.; NONOMURA, H. Humic Acid-Vitamin Agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, No. 5, p. 501-509, 1987.

HEUER, H.; SMALA, K. "Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) for Studying Soil Microbial Communities." In: van Elsas, J.D., Wellington, E.M.H., Trevors, J.T. (eds): **Modern Soil Microbiology**. Marcel Dekker New York, p. 353–373, 1997.

HOGG, S. **Essential microbiology**. New York: John Wiley. 2005. 468 p.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HOZZEIN, W. N.; RABIE, W.; ALI, M. I. A. Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 12, p. 2295-2301, 2011.

(IBAMA) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ecosistemas. Caatinga. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/caatinga.htm>>. Acesso em: 03 nov. 2012.

(IBGE) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sala de imprensa. Mapa de Biomas e de Vegetação. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169>. Acesso em: 03 nov. 2012.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OSAKI, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, v. 16, p. 218-224, 1971.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. "Evolution of protein molecules." In: Munro, H. N. (ed) *Mammalian protein metabolism*, vol 3. Academic Press, New York, pp 21–123. 1969.

KIM, D.; CHUN, J.; SAHIN, N.; HAH, Y. C.; GOODFELLOW, M. "Analysis of Thermophilic Clades Within the Genus *Streptomyces* by 16S rRNA Ribosomal DNA Sequence Comparisons. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 46:581–587. 1996.

KRISHNAVENI, J.; RADZOM, M.; ZEECK, A.; KISHAN, V. Taxonomy, fermentation, biological activities, isolation and characterization of metabolites obtained from a new strain of *Streptomyces noursei* (KC46). **Indian Journal of Biotechnology**. v.10, p. 212-218, 2011.

LAIDI, R. F.; SIFOUR, M.; SAKR, M.; HACENE, H. A new actinomycete strain SK4-6 producing secondary metabolite effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2235-2241, 2008.

LAZZARINI, A.; L. CAVALETTI; G. TOPPO; F. MARINELLI. Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 399-405, 2000.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. *Ecologia e conservação da caatinga*. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003. 822 p.

LECHEVALIER, H. A. **A practical guide to generic identification of actinomycetes**. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Williams & Wilkins, v. 4, 1989.

LIMA, J. L. S. **Plantas forrageiras das caatingas: usos e potencialidades**. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA: PNE: RBG-KEW, 1996, 44 p. il.

LINS, C. V. Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de actinobactérias da rizosfera da planta catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.). Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

LIRA-CADETE et al. Isolamento de bactérias associadas a plantas do bioma caatinga no semiárido nordestino. Embrapa Meio Ambiente – Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS E DESERTIFICAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO, 3., 2011, Juazeiro. Experiências para mitigação e adaptação: anais. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MAIA, G. N. **Árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z, 2004.

MANGAMURI, U. K.; MUVVA, V.; PODA, S.; KAMMA, S. Isolation, Identification and Molecular Characterization of rare actinomycetes from mangrove ecosystem of Nizampatnam. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 8 (2), 2012, p. 83-91.

MELO, F. M. Bioprospecção de Actinobactérias da rizosfera de milho (*Zea mays* L.) com atividade antifúngica. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 647 p.

MENDES, T. D. Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas *Atinni* (Hymenoptera: Formicidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

NONOMURA, H. & OHARA, Y. Distribution of actinomycetes in soil. VIII. Green spore group of Microtetraspora, its preferential isolation and taxonomic characteristics. **Journal of Fermentation Technology**, v. p. 49, 1–7, 1971.

PARK, Y. H.; YOON, J. H.; SHIN, Y. K.; SUZUKI, K.; KUDO, T.; SEINO, A.; KIM, H. J.; LEE, J. S.; LEE, S. T. Classification of '*Nocardioides fulvus*' IFO 14399 and *Nocardioides* sp. ATCC 39419 in *Kribbella* gen nov., as *Kribbella flavida* sp. nov. and *Kribbella sandramycini* sp. nov. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 743–752, 1999.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. v. 2. São Paulo: MacGraw-Hill Ltda, 1981.

PEREIRA, J. C. **Interações entre as Populações de Actinomicetos e outros Organismos na Rizosfera**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 15p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118).

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 4. ed. The MacGraw-Hill Companies, United States, 1999.

REDDY, T. V.; MAHMOOD, S.; PARIS, L.; REDDY, Y. H.; WELLINGTON, E. M.; IDRIS, M. M. *Streptomyces hyderabadensis* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 61, p. 76–80, 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbour-Joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4:404–425. 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. "Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.

SCHISTEK, H.; SEYFFARTH, J. A.; KIILL, L. H. P.; DRUMOND, M. A.; PIMENTEL, R. M. M.; CASTRO, R.; SALES, M. T. B. F.; ALBUQUERQUE, U. P.

Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro. **Revista do Instituto Humanistas Unisinos**. 389 ed. São Leopoldo, 2012.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. "Methods for Characterization of *Streptomyces* Species." **International Journal of Systematic Bacteriology**, 16: 313-340. 1966.

SILVA, G. R. Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma Caatinga. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA, K. S. T.; LIMA, A.; ALMEIDA, A. M. Estudo da sazonalidade da Caatinga com dados do sensor MODIS. Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto – SBSR. Curitiba: 2011. p.1881.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007.

STACH, J. E. M.; MALDONADO, L. A.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T. "New Primers for the Class Actinobacteria: Application to Marine and Terrestrial Environments." **Environmental Microbiology**, 5: 828–841. 2003.

STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28:2731–2739. 2011.

THAKUR, D.; YADAV, A.; GOGOI, B. K.; BORA, T. C. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 17, p. 242-249, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. B.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRUJILLO, M. E.; KROPPESTEDT, R. M.; SCHUMANN, P.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. *Kribbella lupini* sp. nov., isolated from the roots of *Lupinus angustifolius*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 407–411, 2006.

UFRPE. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Catálogo de plantas medicinais da Caatinga: guia para ações de extensão. Ulysses Paulino de Albuquerque (org.) et al. Bauru, SP: Canal6, 2010. 68 p.

VASCONCELLOS, R. L. F.. Actinobactérias da rizosfera de *Araucária angustifolia* com potencial biotecnológico. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola). ESALQ/USP, Piracicaba, 2008.

VASCONCELLOS, R. L. F.; SILVA, M. C. P.; RIBEIRO, C. M.; NOGUEIRA CARDOSO, E. J. B. N. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 6, p. 743-746, 2010.

VELHO-PEREIRA, S.; KAMAT, N. M. Screening of actinobacteria for antimicrobial activities by a modified "Cross-Streak" method. **Nature Precedings**, p. 1-16, 2012.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495-548, 2007.

VIJAYAKUMAR, R.; MUTHUKUMAR, C.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A.; SARAVANAMUTHU, R. Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. **Actinomycetologica**, v. 21, p. 59–65, 2007.

VOLOKHOV, D. V.; SIMONYAN, V.; DAVIDSON, M. K.; CHIZHIKOV, V. E. "RNA Polymerase Beta Subunit (rpoB) Gene and the 16S-23S rRNA Intergenic Transcribed Spacer Region (ITS) as Complementary Molecular Markers in Addition to the 16S rRNA Gene for Phylogenetic Analysis and Identification of the Species of the Family Mycoplasm." **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 62: 515–528. 2012.

WAKSMAN, S. A. The actinomycetes: classification, identification and descriptions of Genera and Species, v. 2, **The Willians and Wilkins Co.** Baltimore. p. 1-363. 1961.

WAKSMAN, S. A.; SCHATZ, A.; REYNOLDS, D. M. Production of Antibiotic Substances by Actinomycetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1213:112-124. 2010.

WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; TRUJILLO, M. E.; LUDWIG, W.; SUZUKI, K. I.; PARTE, A. "**Bergey's Manual® Of Systematic Bacteriology**." v. 5. Springer. 2012.

WU, X. C.; CHEN, W. F.; QIAN, C. D.; LI, Q.; LI, P.; WEN, Y. P. Isolation and Identification of Newly Isolated Antagonistic Streptomyces sp. Strain AP19-2 Producing Chromomycins. **The Journal of Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 499-504, 2007.

ZHANG, G.; CAO, T. YING, Y., MA, L. Diversity and novelty of actinobacteria in Arctic marine sediments. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 4, p. 743-54, 2014.

ZHANG, Y.; MU, J.; FENG, Y.; KANG, Y.; ZHANG, J.; GU, P.J.; WANG, Y.; MA, L.F.; ZHU, Y.H. Broad-Spectrum Antimicrobial Epiphytic and Endophytic Fungi from Marine Organisms: Isolation, Bioassay and Taxonomy. **Marine Drugs**, v. 7, p. 97-112, 2009.

ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; GUAN, T.; XIAO, J.; CHEN, Q.; XU, J.; LINDSTROM, K.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; STROBEL, G. A. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in *Panxi Plateau*, China. **Current Microbiology**, v. 62, p.182–190, 2011.

ZHAO, X.; JIAO, W.; JIANG, B.; YUAN, W.; YANG, T.; HAO, S. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 859–866, 2009.

ZIMERMAN, R. A. **Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência bacteriana**. Ministério da saúde: Brasília, 2010.

ZUCCHI, T. D. Diversidade e taxonomia polifásica de actinobactérias isoladas de áreas de reflorestamento. Biblioteca virtual. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/projetos-jovens-pesquisadores/39287/diversidade-taxonomia-polifasica-actinobacterias-isoladas/>>. Acesso em: 04 nov. 2012.

ANEXOS

A. Tampão PBS – Phosphate Buffered Saline (10X concentrado)

- NaCl----- 85,0 g
- Na₂HPO₄anidro-----17,5 g
- Na₂HPO₄H₂O ----- 1,5 g
- Ágar----- 15,0 g
- Água destilada ----- 1000 mL

(pH 7,1-7,3)

B. Arginina Levedura Ágar (ALA) (NONOMURA e OHARA, 1971)

- L-arginina ----- 0,3 g
- Glicose ----- 1,0 g
- Glicerol ----- 1,0 g
- K₂HPO₄----- 0,3 g
- MgSO₄.7H₂O ----- 0,2 g
- KCl ----- 0,3 g
- Extrato de levedura -- 1,0 g
- Água destilada-----1000 mL
- Agar ----- 20,0 g

(pH 7,4)

C. HT-Ágar (WAKSMAN, 1961)

- Dextrina ----- 10,0 g
- Extrato de Levedura----- 1,0 g
- Extrato de Carne ----- 1,0 g
- Casitone ou Tryptone--- 2,0 g
- CaCl₂.7H₂O ----- 0,02 g
- H₂O ----- 1000 mL
- Ágar ----- 20,0 g

(pH 7,3)

D. MC-Ágar (NONOMURA e OHARA, 1971)

- Glicose ----- 0,3 g

- NaNO₃ ----- 0,5 g
 - K₂HPO₄ ----- 0,3 g
 - MgSO₄.7H₂O ----- 0,3 g
 - KCl ----- 0,3 g
 - Água destilada-----1000 mL
 - Agar ----- 20,0 g
- (pH 7,4)

Solução de Traços de Sais (as quantidades abaixo são para 1 L de meio)

- FeSO₄.7H₂O -----10 mg
- MnSO₄.7H₂O ----- 1,0 mg
- CuSO₄.5H₂O ----- 1,0 mg
- ZnSO₄.7H₂O ----- 1,0 mg

E. **HV-Ágar** (HAYAKAWA E NONOMURA, 1987)

- KCl ----- 1,7 g
 - Ácido húmico----- 1,0 g
 - Na₂HPO₄ ----- 0,5 g
 - MgSO₄.7H₂O ----- 0,05 g
 - FeSO₄.7H₂O ----- 0,02 g
 - CaCO₃ ----- 0,02 g
 - H₂O ----- 1000 mL
 - Ágar ----- 20,0 g
- (pH 7,2)

*Vitaminas do Complexo B:

- Tiamina HCl ----- 0,5 mg
- Riboflavina ----- 0,5 mg
- Niacina ----- 0,5 mg
- Piridoxina HCl ----- 0,5 mg
- Inositol ----- 0,5 mg
- Panteonato de cálcio ----- 0,5 mg
- Ácido P-aminobenzóico ----- 0,5 mg
- Biotina ----- 0,25 mg

- Acti-dione ----- 0,50 mg

F. Meio Müller-Hinton (MH)

- Extrato de carne5,0 g
 - Peptona bacteriológica17,5 g
 - Amido 15,0 g
- (pH 7,0)

G. Meio Sabouraud (SAB)

- Peptona bacteriológica 10,0 g
 - Glicose 40,0 g
 - Ágar15,0 g
 - Água destilada1000 mL
- (pH 5,6)

H. Meio de Produção de Euromicina (MPE)

- Glicose ----- 20,0 g
 - Farinha de soja ----- 20,0 g
 - NaCl ----- 5,0 g
 - CaCO₃ ----- 2,0 g
 - Água destilada ----- 1000 mL
- (pH 7,0)

I. Meio 1 (M1)

- Glicose ----- 10,0 g
 - Farinha de soja ----- 10,0 g
 - NaCl ----- 5,0 g
 - CaCO₃ ----- 1,0 g
 - Água destilada ----- 1000 mL
- (pH 7,0)

J. International Streptomyces Project Medium 3 (ISP3) modificado (SHIRLING E GOTTLIEB, 1966)

- Farinha de aveia ----- 20,0 g

- Ágar ----- 20,0 g
- Água destilada ----- 1000 mL

(pH 7,2)

Solução de Traços de Sais (as quantidades abaixo são para 1 L de meio)

- FeSO₄.7H₂O -----0,1 mg
- MnCl₂ 4H₂O -----0,1 mg
- ZnSO₄ 7H₂O ----- 0,1 mg

K. Ciclamicina

- Dextrosol----- 10,0 g
- Glicerina ----- 10,0 g
- Farinha de soja ----- 10,0 g
- NaCl ----- 5,0 g
- CaCO₃ ----- 1,0 g
- Extrato de levedura ----- 0,5 g
- Água destilada ----- 1000 mL

(pH 7,0)

L. International Streptomyces Project Medium 2 (SHIRLING E GOTTLIEB, 1966)

- Extrato de levedura4,0 g
- Extrato de malte10,0 g
- Dextrose4,0 g
- Água destilada1000 mL

(pH 7,2)

M. Tampão TAS

- Tris-HCl50 mmol.L⁻¹
- EDTA (pH 8,0)50 mmol.L⁻¹
- NaCl150 mmol.L⁻¹

Observação: Apenas os meios de cultura listados acima foram esterilizados em autoclave a 121° C/15 min.

N. Clorofil

- Clorofórmio24,0 mL

- Álcool isoamílico 1,0 mL

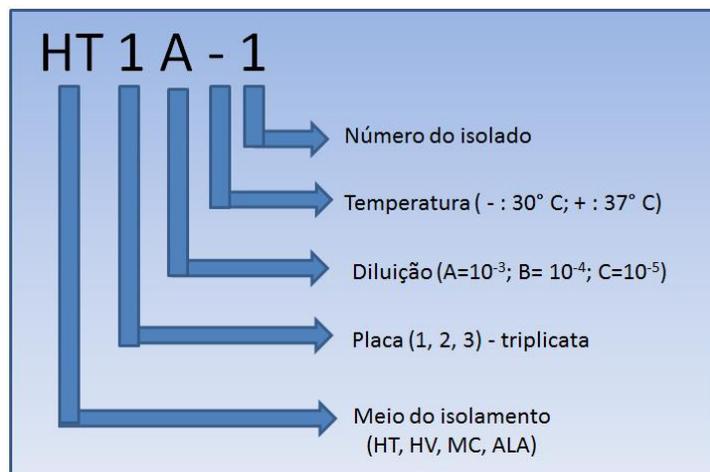
O. Tampão TE

- Tris-HCl10,0 mmol.L⁻¹

- EDTA (pH 8,0)1,0 mmol.L⁻¹

APÊNDICES

APÊNDICE A - Código dos isolados empregado no isolamento de actinobactérias da rizosfera da planta Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.).



APÊNDICE B – Caracterização morfológica das actinobactérias isoladas da Caatinga.

| Identificação numérica | Código dos isolados | Micélio Aéreo | Micélio vegetativo | Pigmentação |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------|
| 2 | HV 1A - 1 | Preto | Branco | Marrom |
| 3 | HV 2A + 5 | Amarelo claro | Amarelo claro | Creme escuro |
| 4 | HV 2B + 8 | Branco | Amarelo claro | Amarelo |
| 5 | ALA 1A + 1 | Branco | Amarelo claro | Creme |
| 6 | HT 2B + 1 | Branco | Amarelo claro | Creme |
| 8 | HT 2C + 4 | Branco gelo | Branco | - |
| 9 | MC 2B + 1 | Branco gelo | Branco gelo | - |
| 10 | ALA 3A + 10 | Cinza | Cinza | - |
| 11 | HT 1B + 6 | Cinza | Branco | Marrom |
| 12 | HT 1A + 14 | Branco | Marrom escuro | Marrom |
| 13 | HV 1A + 15 | Branco | Branco | Roxo |
| 14 | HT 1A + 12 | Branco | Branco | - |
| 15 | HV 2A + 8 | Branco aveludado | Branco | Roxo |
| 16 | HT 2A + 15(a) | Branco aveludado | Branco | Roxo |
| 17 | HT 2A + 15(b) | Branco aveludado | Branco | Roxo |
| 18 | MC 3B - 4 | Branco aveludado | Branco | Roxo |
| 19 | ALA 3A + 5 | Branco | Branco | Roxo |
| 20 | HV 3A - 11(a) | Branco aveludado | Branco | Roxo |
| 21 | HV 3A - 11(b) | Branco aveludado | Branco | Roxo |
| 22 | ALA 1A + 8 | Vermelho | Branco algodão | Vermelho |
| 23 | HV 2A + 3 | Vermelho | Branco algodão | Vermelho |
| 24 | HT 1A + 11 | Vermelho | Branco | - |
| 25 | ALA 2A + 1 | Vermelho | Branco | - |
| 26 | HT 3A + 12 | Branco aveludado | Vermelho | Vermelho |
| 27 | HT 2A + 13 | Branco aveludado | Vermelho | Marrom |
| 28 | HT 1A - 16 | Branco aveludado | Vermelho | Vermelho |
| 29 | HV 2A - 18 | Amarelo claro | Creme | Creme |
| 30 | HT 1A + 16 | Branco | Branco | - |
| 33 | ALA 1A + 2 | Branco aveludado | Branco | Não possui |
| 34 | ALA 1C + 1(a) | Branco aveludado | Branco | Não possui |
| 35 | HV 1A - 2(b) | Branco aveludado | Branco | Roxo |
| 36 | HV 3B + 4 | Branco | Branco | - |
| 37 | MC 1A + 8 | Branco aveludado | Amarelo | - |
| 38 | HV 3B + 2 | Cinza | Marrom | Marrom |
| 40 | HT 2B - 10 | Amarelo | Marrom | Marrom |
| 41 | HT 2A + 16 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 42 | HV 3A + 5 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 43 | HT 2A + 14 | Cinza | Cinza | - |
| 44 | MC 2A - 6 | Cinza | Cinza | - |
| 45 | HT 2A + 12 | Cinza | Cinza | - |
| 46 | HV 2A + 10 | Cinza | Cinza | - |
| 47 | ALA 2A + 5 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 48 | ALA 3A + 8 | Cinza | Cinza | - |

| | | | | |
|----|------------------|------------------------|---------------|--------|
| 49 | ALA 2A - 5 | Cinza | Cinza | - |
| 50 | HV 3A + 15 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 51 | ALA 1B - 1 | Cinza | Cinza | - |
| 52 | HT 2A + 16 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 53 | MC 3A + 5 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 54 | HV 3A + 11 | Cinza azulado | Branco | Verde |
| 55 | HV 2A - 8(a) | Cinza | Cinza | Marrom |
| 56 | HV 2A - 8(b) | Cinza | Marrom | Marrom |
| 57 | HV 2A + 9 | Cinza esbranquiçado | Cinza | - |
| 58 | HV 2B + 5 | Cinza | Cinza | - |
| 59 | HT 1A + 13 | Cinza | Cinza | - |
| 60 | HV 2A + 11 | Cinza esbranquiçado | Cinza | Marrom |
| 61 | HV 3A - 9 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 62 | MC 2B + 2 | Cinza | Cinza | - |
| 63 | HV 3B + 4 | Cinza | Cinza | - |
| 64 | MC 3B + 3 | Cinza | Cinza claro | - |
| 65 | HV 2A + 7 | Cinza claro | Cinza claro | - |
| 66 | HV 2A + 13 | Cinza claro | Cinza | - |
| 67 | MC 1A - 7 | Cinza claro | Cinza claro | - |
| 68 | HV 1A - 5 | Cinza claro | Cinza | - |
| 69 | HV 3A - 7 | Branco | Branco | - |
| 70 | HV 2B - 5 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 71 | HV 2B + 6 | Branco | Amarelo | - |
| 73 | ALA 2A + 2 | Cinza | Cinza | - |
| 74 | HT 1A + 17 | Cinza | Cinza | - |
| 75 | HV 3A + 3 | Branco | Cinza | - |
| 76 | MC 3B - 5 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 77 | HV 1A + 14 | Cinza | Cinza | - |
| 78 | HV 1B + 1 | Branco | Vinho | Vinho |
| 79 | HT 2A + 2 | Cinza | Amarelo | Marrom |
| 80 | HT 2C + 1 | Branco | Branco | Marrom |
| 81 | MC 1A - 8 (a) | Cinza | Cinza | - |
| 82 | MC 1A - 8 (b) | Cinza | Cinza | Marrom |
| 83 | HV 3A + 15 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 84 | MC 1A - 8 (c) | Branco | Cinza | - |
| 85 | MC 2A + 10(b) | Cinza azulado | Cinza azulado | Preto |
| 87 | MC 3A - 11 | Cinza | Cinza | - |
| 89 | HT 2A + 13 | Cinza | Cinza | - |
| 90 | HV 3A - 2 | Cinza | Cinza | Preto |
| 91 | HV 3A + 8 | Cinza | Cinza | Marrom |
| 92 | HV 3A - 2 | Cinza | Cinza | Preto |
| 93 | HV 2A - 5 | Azul | Cinza | - |
| 94 | HV 1A - 3 | Verde | Verde | - |

| | | | | |
|------------|------------|-------------------|---------------|--------|
| 95 | HV 1A - 7 | Verde azulado | Verde azulado | - |
| 96 | MC 3A + 6 | Cinza escuro | Cinza | - |
| 97 | HV 3A - 3 | Cinza amarronzado | Marrom | Marrom |
| 98 | HV 3A + 8 | Cinza | Cinza | - |
| 99 | HT 1B + 9 | Cinza | Cinza | - |
| 101 | HV 1A + 1 | Cinza azulado | Cinza | - |
| 102 | HV 3A - 8 | Cinza | Cinza | - |
| 103 | HV 3A - 3 | Branco | Cinza | - |
| 104 | ALA 2A + 1 | Branco | Vermelho | - |
| 105 | ALA 2A + 4 | Branco | Vermelho | - |

(-) : Não apresentou pigmento.

APÊNDICE C – Diâmetros dos halos de inibição (em milímetros), das linhagens de actinobactérias isoladas da rizosfera da Caatinga, para diferentes micro-organismos teste.

| Isolados | Micro-organismos teste | | | | | | | |
|----------|------------------------|------------------|-------------|----------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|
| | <i>B. subtilis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>MRSA</i> | <i>E. coli</i> | <i>Klebsiela</i> sp. | <i>Candida</i> sp. | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Aspergillus</i> sp. |
| 3 | * | 18,0±0,1 | 18,0±0,1 | * | * | * | * | * |
| 4 | 24,0±0,1 | * | * | * | * | * | * | * |
| 5 | 13,5±0,15 | 14,0±0,0 | * | * | * | 18,0±0,0 | 12,0±0,0 | * |
| 6 | * | 14,5±0,05 | 14,5±0,05 | * | * | 14,0±0,1 | 11,5±0,05 | * |
| 11 | * | * | 10,0±0,0 | * | * | * | * | * |
| 12 | 18,0±0,1 | 13,0±0,3 | 14,0±0,0 | * | * | * | * | * |
| 13 | * | 12,0±0,0 | * | 11,5±0,05 | * | * | * | * |
| 14 | * | 11,5±0,05 | * | * | * | * | * | * |
| 15 | * | 10,0±0,0 | 10,0±0,0 | * | * | * | * | * |
| 16 | * | 11,5±0,05 | 11,5±0,05 | * | * | * | * | * |
| 17 | * | * | 11,5±0,05 | * | * | * | * | * |
| 20 | * | 14,5±0,05 | 12,5±0,05 | * | * | * | * | * |
| 21 | * | 13,5±0,05 | 10,0±0,0 | * | * | * | * | * |
| 22 | 24,0±0,0 | 20,5±0,05 | 19,0±0,1 | * | * | 22,5±0,25 | 15,5±0,15 | 21,5±0,15 |
| 23 | * | * | * | * | * | 21,0±0,0 | 13,5±0,15 | 24,5±0,05 |
| 24 | * | * | * | * | * | 20,5±0,05 | 17,5±0,35 | 22,0±0,1 |
| 25 | * | * | * | * | * | 20,0±0,0 | 14,0±0,3 | 20,0±0,0 |
| 27 | 14,0±0,1 | 13,5±0,05 | 15,5±0,05 | 12,5±0,05 | 11,0±0,0 | 22,0±0,1 | * | * |
| 35 | 13,5±0,15 | 10,0±0,1 | 11,0±0,0 | * | * | * | * | * |
| 37 | * | * | * | * | * | 11,5±0,05 | * | * |
| 38 | * | * | * | * | * | * | 11,0±0,0 | * |
| 41 | * | 14,0±0,1 | * | * | * | * | 11,0±0,0 | * |
| 43 | * | * | * | * | * | 17,5±0,25 | * | * |
| 47 | * | 15,0±0,0 | * | 13,5±0,05 | 10,0±0,0 | * | * | * |
| 50 | * | 1,0±0,0 | * | * | * | * | 14,5±0,25 | * |
| 52 | * | * | * | * | * | * | 18,5±0,15 | * |
| 53 | * | * | * | * | * | * | 15,0±0,0 | * |
| 58 | * | * | * | * | 10,0±0,0 | * | * | * |
| 60 | * | * | * | * | 10,0±0,0 | * | * | * |
| 61 | * | * | * | * | 10,0±0,0 | * | * | * |
| 65 | * | * | 19,0±0,1 | * | * | * | * | * |
| 66 | * | * | * | * | 10,0±0,0 | * | * | * |
| 67 | 22,0±0,0 | * | 19,0±0,1 | * | * | * | * | * |
| 68 | 23,0±0,2 | * | 13,5±0,05 | * | * | * | * | * |
| 69 | 23,0±0,1 | * | * | * | * | * | * | * |
| 70 | * | * | * | * | * | * | 22,5±0,55 | 16,0±0,0 |
| 71 | * | * | * | * | * | * | * | 16,5±0,15 |
| 74 | 31,0±0,1 | 26,5±0,05 | 24,0±0,0 | * | * | 12,0±0,0 | 15,0±0,0 | * |
| 78 | * | 16,5±0,05 | 15,0±0,0 | * | * | * | 15,0±0,0 | * |

| | | | | | | | | |
|------------|-----------|-----------|-----------|---|---|---|-----------|-----------|
| 79 | * | * | * | * | * | * | 14,0±0,1 | * |
| 81 | 28,0±0,2 | * | 19,5±0,15 | * | * | * | * | * |
| 82 | 29,0±0,1 | * | 25,0±0,0 | * | * | * | * | * |
| 83 | * | * | * | * | * | * | 19,5±0,05 | 14,5±0,05 |
| 84 | 28,0±0,0 | 20,5±0,05 | 26,5±0,05 | * | * | * | * | * |
| 89 | 24,5±0,05 | * | 22,5±0,05 | * | * | * | * | * |
| 90 | 13,0±0,0 | 18,0±0,0 | 14,5±0,05 | * | * | * | * | * |
| 91 | 13,0±0,1 | * | 10,0±0,0 | * | * | * | * | 23,0±0,2 |
| 92 | 12,0±0,0 | 17,5±0,05 | 11,5±0,05 | * | * | * | * | * |
| 96 | 15,0±0,0 | * | * | * | * | * | * | 10,5±0,05 |
| 97 | 13,0±0,0 | 11,0±0,0 | * | * | * | * | 16,0±0,1 | 10,0±0,0 |
| 98 | 20,5±0,05 | * | 10,0±0,0 | * | * | * | 19,5±0,25 | 16,5±0,15 |
| 101 | 12,5±0,45 | * | * | * | * | * | * | * |
| 102 | 20,5±0,05 | * | * | * | * | * | * | * |

*: Ausência de atividade antimicrobiana

Micro-organismos teste: UFPEDA 86 – *B. subtilis*; UFPEDA 02 – *S. aureus*; UFPEDA 705 – *MRSA*; UFPEDA 224 – *E. coli*; UFPEDA 396 – *K. pneumoniae*; UFPEDA 1007 – *C. albicans*; UFPEDA 2331 – *F. oxysporum*; 2003 – *A. niger*.

APÊNDICE D – Variação de pH do isolado 74 durante 120 horas de fermentação nos diferentes meios de fermentação.

| Meios | Tempo | | | | |
|--------------------|-------|-----|-----|-----|------|
| | 24h | 48h | 72h | 96h | 120h |
| M1 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| MPE | 7 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| ISP3 | 6 | 6 | 7 | 8 | 8 |
| Ciclamicina | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |

APÊNDICE E – Concentração de massa celular do isolado 74, durante 120 horas nos diferentes meios de fermentação (biomassa em miligramas).

| Meios | Tempo | | | | |
|--------------------|-------|------|------|-------|------|
| | 24h | 48h | 72h | 96h | 120h |
| M1 | 3,05 | 5,8 | 4,4 | 9,3 | 4,7 |
| MPE | 9,05 | 12,4 | 10,1 | 13,45 | 8,95 |
| ISP3 | 3,45 | 5,6 | 5,2 | 4,35 | 8,9 |
| Ciclamicina | 3,4 | 5,5 | 8,95 | 8,9 | 9,4 |

APÊNDICE F – Avaliação da atividade antimicrobiana do isolado 74 durante 120 horas do processo fermentativo, em diferentes meios de cultura.

| Atividade antimicrobiana, Halos de Inibição (mm) | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|------|-----------|------|-------|----------------------------|------|-----------|------|-------|-----------------|------|-----------|------|-------|
| Meios | <i>Bacillus</i> sp. UFPEDA-86 | | | | | <i>S. aureus</i> UFPEDA-02 | | | | | MRSA UFPEDA-705 | | | | |
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
| MPE | * | * | 20 | * | 15 | * | * | 20 | * | 20 | * | * | 21 | * | 20 |
| M1 | 9 | 10 | * | * | * | * | 7 | 10 | * | 10 | * | 12 | 8 | 9 | 7 |
| ISP3 | 5 | | 15 | * | * | 7 | 8 | 16 | * | 17 | 5 | 11 | 13 | 10 | 10 |
| Ciclamicina | * | 10 | 12 | * | * | 5 | 13 | 17 | 20 | 17 | * | 9 | 17 | 17 | 14 |