



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA - CAMPUS V
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

VITÓRIA GASPAR BERNARDO

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS EDÁFICAS DO
SEMIÁRIDO PARAIBANO**

**JOÃO PESSOA
2022**

VITÓRIA GASPAR BERNARDO

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS EDÁFICAS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Microbiologia aplicada.

Orientador: Profa. Dra. Brígida Thaís Luckwu de Lucena.

**JOÃO PESSOA
2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

B523a Bernardo, Vitória Gaspar.
Análise da atividade antimicrobiana de bactérias edáficas do semiárido paraibano [manuscrito] / Vitória Gaspar Bernardo. - 2022.
50 p. : il. colorido.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2022.
"Orientação : Profa. Dra. Brígida Thaís Luckwu de Lucena, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."

1. Bioprospecção. 2. Antimicrobianos. 3. Caatinga. I. Título
21. ed. CDD 615.32

VITÓRIA GASPAR BERNARDO

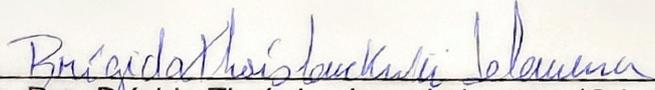
ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS EDÁFICAS DO
SEMIÁRIDO PARAIBANO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Microbiologia
aplicada.

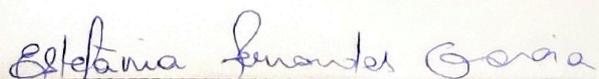
Aprovada em: 20/07/2022.

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Brígida Thais Luckwu de Lucena (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Daniela Santos Pontes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Estefania Fernandes Garcia
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Dra. Brígida Thaís Luckwu de Lucena, pelo suporte tanto acadêmico quanto pessoal ao longo da minha iniciação como pesquisadora. Pelas palavras e ações de encorajamento, me fornecendo diversas oportunidades de amadurecimento enquanto pesquisadora e pessoa.

Ao corpo docente do curso de Ciências Biológicas da UEPB pela didática e comprometimento com o aprendizado do aluno. Aos funcionários administrativos e técnicos laboratoriais que contribuíram para o andamento eficiente das atividades acadêmicas. Agradeço também, a UEPB pela infraestrutura, financiamentos e oportunidades proporcionadas, permitindo minha iniciação na carreira científica e acadêmica.

Aos amigos, Ana Luiza Macedo, Jessica Sobral de Souza, Roberta Gonçalves, Romulo Leite Ramalho e Virginia Milani pelas conversas descontraídas, pelos momentos de prestígio e desabafo, e principalmente pelos nossos encontros de jogos e fofocas.

Aos meus pais pela confiança e suporte às minhas escolhas, sacrificando o desejo de permanência ao seu lado para permitir que eu siga em busca dos meus objetivos.

Por fim, ao meu companheiro Bruno Sidnei Guerra Passeti, por compartilhar a vida comigo, desde tão novo, mesmo distante da família. Por sua confiança, apoio nas tarefas cotidianas, e por seu incentivo tanto intelectual quanto pessoal.

RESUMO

O crescente surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos (MDR) é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, pois reduz as possibilidades de tratamento de doenças infecciosas, tornando a descoberta de novos antimicrobianos extremamente necessária. Nesse sentido, tais compostos podem ser produzidos naturalmente por bactérias isoladas das regiões semiáridas. As quais se mostram uma fonte promissora para novos compostos bioativos, já que as condições a que estão sujeitas podem ativar diferentes vias metabólicas e, conseqüentemente, podem levar à produção de metabólitos secundários ainda não estudados, considerando que esse ambiente ainda é pouco explorado quanto a aplicação biotecnológica de sua microbiota. Diante desses fatos, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de bactérias do solo do semiárido paraibano. Para isso, foi avaliado o líquido metabólico de 60 isolados bacterianos através do método de difusão em poço, contra *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas hydrophila*. Entre os quais, os isolados SJC 6.16 (*Paenibacillus sp.*), SJC 2.21 (*Enterobacter sp.*), SJC 5.11 e 5.12 (*Bacillus cereus*) demonstraram atividade antimicrobiana em experimentos em que não houve separação completa entre fase celular e líquida. Com isso, foi realizada a avaliação direta do conteúdo celular desses isolados pelo método de bloco de gelose. E todos se mostraram ativos frente a *A. hydrophila*, adicionalmente, SJC 6.16 e SJC 5.11 apresentaram atividade frente a *S. enteritidis*, SJC 2.21 frente a *S. aureus*, e, por fim, SJC 5.11 e SJC 5.12 frente a *S. aureus*, *S. typhimurium* e *E. coli*. Assim, a partir dos resultados obtidos até o momento, pode-se inferir que tais isolados constituem potenciais candidatos para a descoberta de novas moléculas antimicrobianas. Dessa forma, o potencial antimicrobiano precisa ser confirmado com a análise do extrato bruto desses isolados frente aos patógenos já testados e a patógenos resistentes.

Palavras-Chave: Bioprospecção; Antimicrobianos; Caatinga.

ABSTRACT

The growing emergence of multiple-drug resistant (MDR) strains is one of the major global health problems, because it reduces the possibilities of infectious diseases treatment, making the discovery of new antimicrobials extremely necessary. In this context, these compounds can be produced by bacteria isolated from semiarid regions. These bacterias display different metabolic pathways leading to the production of unknown secondary metabolites, whereas this environment is underexplored regarding the biotechnological application of its microbiota, making them a promising source of new bioactive compounds. Therefore, this study aimed to evaluate the antimicrobial potential of bacterias from semiarid soil. To this, the metabolic liquid of 60 isolates was evaluated by the well diffusion method, against *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Aeromonas hydrophila*. In experiments that did not have complete separation between cellular and liquid phases, four isolates, in particular, SJC 6.16 (*Paenibacillus sp.*), SJC 2.21 (*Enterobacter sp.*), SJC 5.11, and 5.12 (*Bacillus cereus*) demonstrated antimicrobial activity. Thus, the evaluation of the cellular content of these isolates was performed by the agar plug diffusion method. All of these isolates have shown to be active against *A. hydrophila*, additionally, SJC 6.16 e SJC 5.11 against *S. enteritidis*, SJC 2.21 against *S. aureus*, and, finally, SJC 5.11 e SJC 5.12 against *S. aureus*, *S. typhimurium* e *E. coli*. Our results showed that these isolates are promising candidates for the discovery of new antimicrobial molecules. Therefore, the antimicrobial potential must be confirmed by crude extract analysis of these isolates against already tested pathogens and resistant pathogens.

Keywords: Bioprospection; Antimicrobials; Caatinga.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Exemplos de Atividade Antimicrobiana Positiva por Diferentes Métodos Dependentes de Cultura	13
Figura 2 -	Esquema passo-a-passo para obtenção do líquido metabólico ...	23
Figura 3 -	Esquema do Método de Difusão em Poço	24
Figura 4 -	Esquema do Método de Bloco de Gelose	26
Figura 5 -	Atividade Antimicrobiana do Líquido Metabólico com Contaminação Celular de Isolados Edáficos	29
Figura 6 -	Halos de Inibição do Isolado SJC 6.16 Avaliado pelo Método de Bloco de Gelose	31
Figura 7 -	Halos de Inibição do Isolado SJC 2.21 Avaliado pelo Método de Bloco de Gelose	31
Figura 8 -	Halos de Inibição do Isolado SJC 5.11 Avaliado pelo Método de Bloco de Gelose	32
Figura 9 -	Halos de Inibição do Isolado SJC 5.12 Avaliado pelo Método de Bloco de Gelose	33
Figura 10 -	Atividade Antimicrobiana Negativa do Líquido Metabólico sem Contaminação Celular dos Isolados SJC 5.11 e SJC 5.12	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Actinobactérias Edáficas Avaliadas Quanto a Atividade Antimicrobiana	21
Tabela 2 - Isolados Edáficos de Firmicutes Avaliados Quanto a Atividade Antimicrobiana	21
Tabela 3 - Proteobactérias Edáficas Avaliadas Quanto a Atividade Antimicrobiana	22
Tabela 4 - Classificação da atividade antimicrobiana	25
Tabela 5 - Atividade Antimicrobiana de Isolados Edáficos Avaliados pelo Método de Bloco de Gelose	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Resistência antimicrobiana	8
1.2	Antimicrobianos de origem natural	10
1.3	Métodos de detecção da Atividade antimicrobiana	11
1.4	Actinobacteria	13
1.5	Firmicutes	14
1.6	Proteobacteria	15
1.7	Potencial biotecnológico da Caatinga	17
2	Objetivo	20
2.1	Objetivos específicos	20
3	METODOLOGIA	21
3.1	Isolados bacterianos	21
3.2	Microrganismos teste	22
3.3	Obtenção do líquido metabólico	23
3.4	Método de difusão em poço	24
3.5	Método de bloco de gelose	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1	Análise do líquido metabólico	27
4.2	Análise pelo método de Bloco de Gelose	30
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A crescente incidência de patógenos resistentes a múltiplas drogas (MDR-*multidrug resistant*) dificulta o tratamento de doenças infecciosas, dessa forma, aumentando o risco de morte por essas infecções, tal fato se configura, portanto, um problema de saúde pública mundial. Assim, ao identificar a gravidade do problema, a organização mundial de saúde (OMS) emitiu uma lista de cepas MDR prioritárias, para as quais há necessidade urgente de produção de novos antibióticos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A maioria dos antibióticos comercializados são de origem natural, ou seja, são compostos produzidos naturalmente, geralmente, por bactérias, fungos e plantas, devido a sua facilidade de cultivo para produção em larga escala. Antimicrobianos naturais apresentam complexidade estrutural e características físico-químicas únicas selecionadas para interação com organismos específicos, o que faz com que sua identificação seja realizada de forma mais rápida, com equipamentos mais baratos e menor gasto de insumos, sendo assim, menos custosa que sua elaboração química (KUNAKOM; EUSTÁQUIO, 2019).

1.1 Resistência antimicrobiana

Os antibióticos combatem patógenos bacterianos em diversos sistemas vivos, evitando a morte de humanos, plantas e animais de interesse econômico. Seu uso impacta diretamente a economia global e a saúde da população humana, combatendo infecções, permitindo a segurança alimentar e, simultaneamente, a produção agropecuária e aquícola em grande escala. Na pecuária, em especial seu uso é corriqueiro, de modo que antibióticos são dados aos animais criados não somente para tratamento, mas também como forma de prevenir infecções e garantir uma maior massa muscular, aumentando os ganhos dos criadores na venda da carne desses animais (GAWRYJOŁEK 2021).

O uso intensivo, e muitas vezes sem necessidade, de antibióticos de amplo espectro na medicina e, principalmente, na pecuária favorece o fenômeno de resistência antimicrobiana, causando a ineficiência do tratamento. Dessa forma,

outros antibióticos são usados, mas a continuação do uso indiscriminado realimenta o ciclo de resistência antimicrobiana gerando patógenos MDR (RICHTER *et al.*, 2019). O descarte inadequado de resíduos contaminados, pulverização agrícola, aplicação de esterco contendo resíduos de antibióticos, saneamento inadequado, grande liberação de metais no ambiente são alguns dos fatores que também podem causar contaminações ambientais que favorecem a disseminação da resistência antimicrobiana (AHMAD *et al.*, 2021). Esse conjunto de fatores vem aumentando as taxas de incidência de patógenos MDR nas últimas décadas, levando a um problema de saúde pública mundial. Por essa razão, torna-se urgente o desenvolvimento de soluções inovadoras para o tratamento dessas doenças, aliadas a soluções sanitárias que reduzam o risco de contaminação (GHOSH *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2021).

Apesar do uso indiscriminado de antibióticos ser um dos fatores que levam a resistência antimicrobiana, tais fármacos são a principal forma de tratamento contra infecções de patógenos MDR. Logo, para a continuidade e eficácia do tratamento de patógenos resistentes é necessária a descoberta de novas moléculas antimicrobianas, as quais podem levar a formação de novos antibióticos, ao aprimoramento de antibióticos já comercializados ou podem servir de base para a produção de fármacos semi-sintéticos (DESRIAC *et al.*, 2013; TRACANNA *et al.*, 2017).

A partir dos anos 90 até 2005 houve um preterimento sobre os antimicrobianos sintéticos por parte das indústrias, em detrimento dos antimicrobianos naturais. Além disso, o investimento para a descoberta de novos antibióticos foi reduzido nos últimos anos devido ao baixo retorno financeiro em relação a outros produtos farmacêuticos de uso prolongado, assim, favorecendo a redução das opções de tratamentos de doenças infecciosas. Esses fatores aliados à demora para a aprovação de medicamentos contribuem para o agravamento do problema de resistência. Atualmente, surtos de patógenos bacterianos ressaltam a necessidade de pesquisas dedicadas à obtenção de novas moléculas antimicrobianas, sejam elas sintéticas ou naturais. A necessidade é tamanha que, governantes e instituições investigam a possibilidade de incentivos econômicos para a descoberta de novos antimicrobianos, flexibilização no processo de aprovação de

antibióticos e até mesmo prolongação do período de patente (DEMAIN, 2014; JIANG *et al.*, 2021; MAHLAPUU; BJÖRN; EKBLÖM, 2020).

1.2 Antimicrobianos de Origem Natural

Organismos produzem moléculas antimicrobianas de forma natural, com finalidade de defesa de patógenos ou até mesmo, no caso de microrganismos, com finalidade competitiva, para garantir a colonização de um ambiente. Esses compostos utilizados na competição geralmente são derivados do metabolismo secundário dos microrganismos, as quais são liberadas no meio e não são essenciais à sobrevivência do organismo, mas podem permitir melhor exploração do meio ambiente, assim como, podem possuir atividade antimicrobiana (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019).

Compostos naturais possuem certa vantagem em relação a compostos sintéticos, pois anos de evolução propiciaram o aprimoramento de ferramentas para competição, como a produção de compostos que impedem o crescimento (bacteriostáticos) ou levam a morte (bacteriocidas) de bactérias competidoras (GRANATO; MEILLER-LEGRAND; FOSTER, 2019). A dinâmica das comunidades microbianas leva a uma coexistência equilibrada de cepas produtoras de antimicrobianos, resistentes e sensíveis. Assim, teoricamente, segundo Garcia-Gutierrez (2019), a presença de bactérias resistentes em um ambiente implica no aprimoramento da produção de antimicrobianos em cepas produtoras, a fim de garantir sua continuidade no mesmo ambiente. Da mesma maneira que a presença de antimicrobianos no meio seleciona bactérias resistentes. Por essas razões, esse autor afirma que, fontes naturais contendo uma ampla diversidade de microrganismos são uma fonte subexplorada de novos antimicrobianos.

Os metabólitos produzidos por bactérias que podem ter atividade antimicrobiana, incluem lipídios, glicolipídios, oligossacarídeos, terpenóides, policetídeos (PKS), aminoácidos, peptídeos sintetizados por vias ribossomais (como bacteriocinas) ou não ribossomais (peptídeos não ribossomais - NRP). Compostos químicos produzidos por bactérias intestinais, como ácidos orgânicos, apresentam atividade antimicrobiana não específica, assim, causando alterações no ambiente ou

mesmo na célula bacteriana como um todo, levando ao estresse celular (GARCIA-GUTIERREZ, 2019).

Apesar da produção de antimicrobianos ser determinada geneticamente, fatores ambientais interferem na produção, alterando a expressão gênica e favorecendo determinadas rotas metabólicas, potencializando a produção de determinado composto (WESTHOFF *et al.*, 2021). Logo, as condições de cultivo são fatores definitivos para a detecção da atividade antimicrobiana.

1.3 Métodos de detecção da atividade antimicrobiana baseados em cultura

Métodos para detecção de compostos bioativos baseados em cultivo são empregados desde a descoberta dos primeiros antibióticos, contudo a detecção de um composto bioativo pode levar muito tempo, sendo desgastante para o pesquisador e, às vezes, não é reprodutível, devido ao uso de diferentes metodologias não padronizadas. Dessa forma, a utilização de métodos dependentes de cultura passou a ser preterida nos últimos anos, mas seu uso ainda é justificado por sua simplicidade, baixo custo e pelo fornecimento de resultados baseados em fenótipo, sendo considerado padrão ouro na detecção de microrganismos bioativos (ALIERO *et al.*, 2018; KHABTHANI; ROLAIN; MERHEJ, 2021; RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

Métodos independentes de cultura podem ser utilizados em associação aos métodos baseados em cultivo, como métodos metagenômicos e a mineração genômica, que buscam genes associados à produção de antibióticos, a fim de agilizar o andamento de pesquisas, detectando potenciais organismos produtores de antimicrobianos. A limitação desse tipo de metodologia tem relação com a expressão gênica, pois a presença de genes associados à produção de antimicrobianos não garante a produção de tais compostos, uma vez que esses genes podem estar inativados ou reprimidos. Por essa razão, a produção de compostos bioativos só pode ser comprovada e bem avaliada com o uso de técnicas que avaliam o fenótipo (GENILLOUD, 2019; HUG *et al.*, 2018).

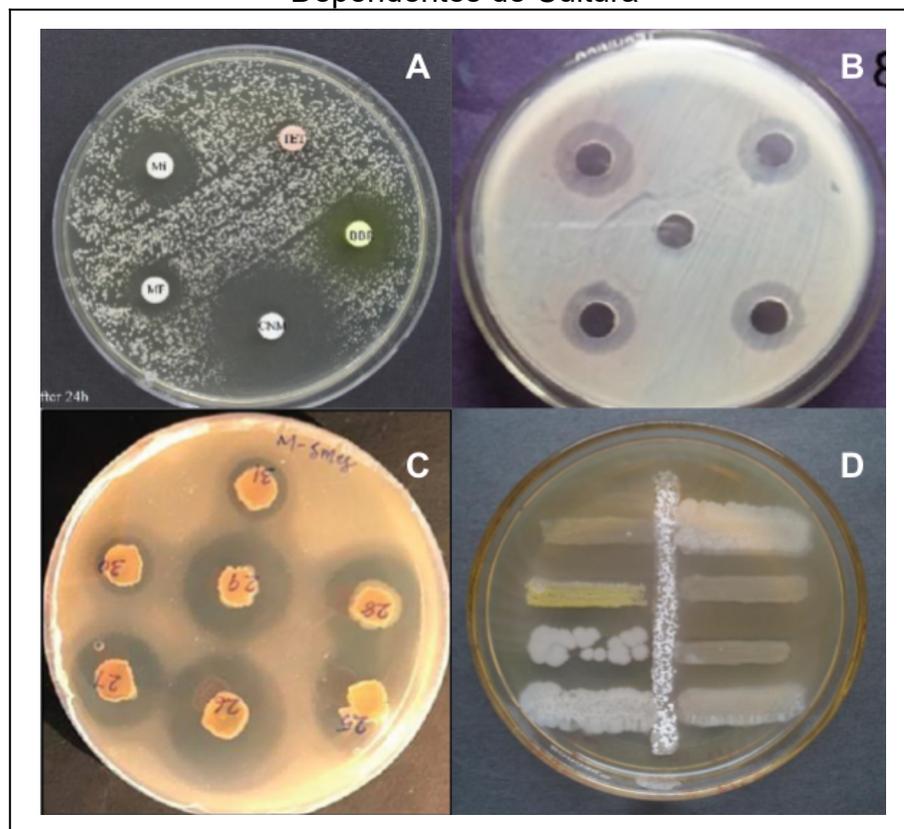
Os métodos baseados no cultivo microbiano incluem a análise do conteúdo celular ou líquido metabólico que consiste na fase líquida do cultivo bacteriano onde

estão apenas compostos secretados pelas células. Um dos métodos mais utilizados em laboratórios de microbiologia é o método de difusão em disco (Figura 1A), o qual se baseia na análise da atividade antimicrobiana do líquido metabólico ou o extrato líquido da bactéria de interesse contido em um disco de papel (BAUER *et al.*, 1966). O método de difusão em poço é uma variação dessa técnica (Figura 1B), consistindo na confecção de furos no meio de cultura, nos quais é introduzido o líquido metabólico (ALAQEEL *et al.*, 2021). Alguns estudos demonstram uma maior sensibilidade do teste de difusão em poço em detrimento do teste em disco (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; VALGAS *et al.*, 2007). Segundo Ramires e Castaño (2009), isso se deve ao fato que os discos de papéis podem reter moléculas devido a carga elétrica da celulose.

Existem, ainda, métodos que avaliam a atividade celular, como, por exemplo, o método de difusão em ágar, conhecido também como método de bloco de gelose (Figura 1C) (ICHIKAWA *et al.*, 1971), e o método de estrias cruzadas (Figura 1D) (VELHO-PEREIRA; KAMAT, 2011). No método de bloco de gelose, blocos de ágar são removidos de uma placa com a bactéria de interesse cultivada, e a cultura celular é colocada em contato com a placa contendo a bactéria patogênica (bactéria teste). Já o método de estrias cruzadas, consiste na confecção de uma estria principal da bactéria de interesse, com o comprimento do diâmetro da placa, seguida de estrias perpendiculares de bactérias teste. Sendo este, um teste rápido, mas que não é indicado para estudos quantitativos, pois, muitas vezes, as zonas de inibição não se apresentam claras e bem delimitadas (VELHO-PEREIRA; KAMAT, 2011).

Tais métodos são bem utilizados para análise qualitativa do potencial antimicrobiano de diversos isolados bacterianos, permitindo uma fácil interpretação da atividade inibitória e a avaliação de múltiplos isolados conjuntamente (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Dessa forma, possibilitando a seleção de potenciais candidatos produtores de novas moléculas antimicrobianas, as quais podem levar a produção de novos antimicrobianos, ou mesmo o aprimoramento da ação dos antibióticos já existentes. Muitos estudos já evidenciaram o potencial antimicrobiano de diferentes bactérias, especialmente, bactérias pertencentes aos filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria (QUINN *et al.*, 2020; KIZHAKKEKALAM; CHAKRABORTY, 2020).

Figura 1: Exemplos de Atividade Antimicrobiana Positiva por Diferentes Métodos Dependentes de Cultura



Fonte: A: Kim *et al.* (2018) ; B: Srivastav e Pofali (2018); C: Ashok *et al.* (2020); D: Kamat e Velho-Pereira (2012).

1.4 Actinobacteria

Um filo que possui grande destaque quanto a produção de antimicrobianos é o filo Actinobacteria, devido, principalmente, ao gênero *Streptomyces*, o qual abrange espécies produtoras de diversos antimicrobianos importantes comercializados, como estreptomicina, neomicina, tetraciclina, rifampicina, entre outros (CHANDRA; KUMAR, 2017; LEE; GOH; CHAN, 2020). Sua diversidade de isolados produtores de compostos bioativos é tamanha que, atualmente, ainda são identificadas novas espécies de *Streptomyces* produtoras de antibióticos contra patógenos MDR, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina (MRSE) e *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenema (QUINN *et al.*, 2020).

Contudo, outros gêneros do grupo também vêm sendo relatados continuamente quanto ao seu potencial antimicrobiano. Na última década, já foi constatada a atividade antibacteriana de isolados endofíticos de *Leifsonia shinshuensis*, *Kocuria palustris* e *Micrococcus yunnanensis* contra cepas MRSA (ASSAD *et al.*, 2021; LEE, 2012; RANJAN; JADEJA, 2017). Corroborando o potencial antimicrobiano de *M. yunnanensis*, Palomo e colaboradores (2013) evidenciaram que bactérias dessa espécie e de *K. palustris* produzem o peptídeo kocurina, conhecido pela ação contra cepas MRSA. A produção de um composto semelhante a kocurina também foi registrada em uma cepa edáfica de *K. kristinae* (KHUSHALANI *et al.*, 2020). Em outro trabalho, o conteúdo celular de um isolado da mesma espécie demonstrou atividade antimicrobiana no teste de estrias cruzadas contra *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Salmonella typhi* e *Aspergillus niger* (ELBENDARY *et al.*, 2018).

A partir dos fatos apresentados, é notório que tanto actinobactérias terrestres quanto marinhas são candidatas promissoras para a descoberta de novos antimicrobianos. No entanto, estudos recentes têm demonstrado um grande potencial antimicrobiano de isolados de outros filos em detrimento das actinobactérias. De modo que, algumas pesquisas revelam que a maioria das bactérias bioativas encontradas em seus trabalhos não são actinobactérias, mas sim pertencem os filos Firmicutes e Proteobacteria (MATOBOLE *et al.*, 2017; KIZHAKKEKALAM; CHAKRABORTY, 2020).

1.5 Firmicutes

O filo Firmicutes possui destaque biotecnológico principalmente devido ao gênero *Bacillus*. Estudos recentes relatam sua atividade antimicrobiana contra diversos fitopatógenos e patógenos clínicos, como *Candida albicans*, *S. aureus* e *Escherichia coli*, mas também relatam a sua atividade catalítica para produção de outros fármacos utilizados no tratamento da obesidade e hiperglicemia (NGUYEN *et al.*, 2021; ROMANENKO *et al.*, 2020; XIE *et al.*, 2021). A atividade catalítica também pode levar a produção de antimicrobianos, o estudo de Schmitz, Zapp e Bernhardt (2012) demonstrou que uma hidroxilase esteróide de *B. megaterium* é capaz de

produzir o composto triterpenóide, $7\beta,11\alpha$ -dihidroxipterocarpol, com potencial farmacológico e seguro citologicamente.

As espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. megaterium* são conhecidas pela produção das bacteriocinas com ação contra diversos patógenos clínicos e até cepas MDR. A bacitracina, gramicidina e polimixina são alguns dos antibióticos comercializados derivados de compostos bioativos de *Bacillus*. Apesar de sua intensa produção de antimicrobianos, poucos fármacos com base nesses antimicrobianos naturais são comercializados devido à alta citotoxicidade desses compostos (STOICA *et al.*, 2019).

Outros gêneros de Firmicutes com potencial antimicrobiano são *Paenibacillus* e *Staphylococcus*. A produção de peptídeos antibióticos é relatada em ambos gêneros. *Staphylococcus warneri* secreta SWLP1 (*Staphylococcus warneri* lantibiotic peptide 1) que apresenta atividade inibitória contra patógenos gram positivos como, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecium*. Enquanto, *Paenibacillus polymyxa* secreta paenibacilina e polimixina, o que garante a esse isolado atividade contra patógenos Gram-positivos e negativos (PETERSEN *et al.*, 2009; RUA *et al.*, 2014; STOICA *et al.*, 2019). Bibi e colaboradores (2018) também relatam a atividade antifúngica de isolados marinhos do gênero *Staphylococcus* contra diversos fitopatógenos.

Portanto, como diversas espécies de Firmicutes demonstram produção de antimicrobianos comprovada, esse filo demonstra ser também uma fonte promissora para busca de antimicrobianos.

1.6 Proteobacteria

O filo Proteobacteria abrange diversos isolados de interesse biotecnológico, com aplicabilidade nos setores industrial, agrícola e médico. Em relação a sua aplicação na indústria, pesquisas investigam o metabolismo de isolados desse filo a fim de obter estratégias para degradação de lignina, a qual pode ser utilizadas na produção de combustíveis e produtos químicos, aumentando a eficiência da produção de combustíveis vegetais (KUMAR *et al.*, 2018; MORYA *et al.*, 2019.).

Quanto à aplicação agrícola, diversos estudos avaliam a capacidade de biocontrole de doenças fúngicas em plantas, constatando atividade antimicrobiana de isolados como *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia* (MACEDO-RAYGOZA *et al.*, 2019; JUNG *et al.*, 2018; ROJAS-SOLIS; ZETTER-SALMON; CONTRERAS-PEREZ, 2018; ZEIDAN *et al.*, 2019).

Neste sentido, destaca-se o gênero *Stenotrophomonas* como fonte potencial de antimicrobianos, Ryan e colaboradores (2009) relatam a capacidade de controle biológico de patógenos fúngicos e bacterianos em culturas vegetais, e também citam a produção de antibióticos e enzimas pela espécie *S. maltophilia*.

Além disso, Seo e colaboradores (2010) registram a atividade antagônica de isolados endofíticos deste gênero e de *Pseudomonas* contra *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* e *Salmonella enterica* KCTC 12456. Nongkhlaw e Joshi (2015) também constataram não só a atividade antagônica de *S. maltophilia* contra *S. aureus* MTCC96, mas também de *Comamonas*.

Segundo Drissi e colaboradores (2015), as bacteriocinas produzidas por Proteobacteria da microbiota intestinal parecem ter maior atividade antibacteriana, comparado a outros filos, devido às cargas catiônicas e estrutura α -hélices. Estas últimas aumentam sua capacidade de interação dependendo do meio, garantindo uma potente atividade antibiótica em diferentes ambientes.

Núñez-Montero e Barrientos (2018) afirmam que Proteobactérias são potenciais fontes naturais de novas moléculas com aplicação farmacêutica. Corroborando essa afirmação, diversos isolados de α -proteobacteria demonstraram atividade contra cepas selvagens de *E. coli*, *C. albicans* e contra *S. aureus* e *S. epidermidis* MDR resistentes a diferentes antibióticos como, oxacilina, penicilina, piperacilina, amoxicilina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina, entre outros (HENTSCHEL *et al.*, 2001).

Ainda, isolados do gênero *Pseudomonas* demonstraram atividade frente a diversas cepas selvagens e resistentes de *E. coli*, *S. aureus*, *E. cloacae*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *K. pneumoniae* (ISMAIL-BEN ALI *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2010). Outros trabalhos também relatam produção de compostos com propriedades antibacterianas por isolados do filo, como holomicina, tiomarinol,

pirrolnitrina, althiomicina, enaciloxina Ila, entre outros (BUIJS *et al.*, 2019; DEPOORTER, 2016; DESRIAC *et al.*, 2013).

Apesar da atividade antimicrobiana e produção de antimicrobianos comprovada, ao que se sabe, nenhum medicamento derivado de compostos bioativos de proteobactérias são comercializados ainda. Além disso, são poucos os estudos que objetivam especificamente a busca por antimicrobianos de proteobactérias. Por essas razões, são necessários estudos mais aprofundados nesse filo, objetivando realizar o isolamento do composto e avaliar sua citotoxicidade para então serem realizados mais estudos clínicos. Assim, a detecção da atividade antimicrobiana de proteobacteria contra isolados clínicos é relevante pois contribui para o embasamento de futuras pesquisas mais aprofundadas.

1.7 Potencial da microbiota do Semiárido

Organismos de diferentes ambientes estão adaptados às suas respectivas condições ambientais específicas, de modo que cada organismo apresenta uma rota metabólica única adaptada para a sua sobrevivência nesse local, esse metabolismo pode levar a produção de composto únicos, os quais podem apresentar potencial biotecnológico (AL-AMOUDI *et al.*, 2016; GRAÇA *et al.*, 2015). Portanto, a origem da bactéria pode ser fundamental para o êxito da busca por isolados produtores de moléculas antimicrobianas.

O solo em si é uma importante fonte de organismos produtores de compostos bioativos, a maioria dos antibióticos naturais estudados advém desse ambiente. Apesar de serem bem estudados quanto a seu potencial biotecnológico, o microbioma dos solos é alvo de pesquisas até os dias atuais, tanto para fins agrícolas quanto para a descoberta de enzimas e outros compostos com aplicação industrial e farmacêutica (ABERA, 2021; ABHINANDAN *et al.*, 2019; CHANDRA; KUMAR, 2017)

Outra potencial fonte de organismos bioativos é o semiárido brasileiro, mais especificamente a Caatinga, cujas condições ambientais peculiares a tornam um local promissor para a busca de microrganismos com potencial antimicrobiano, no

entanto, ainda é um ambiente pouco explorado do ponto de vista biotecnológico. Esse ecossistema é considerado um ambiente extremo por alguns autores por apresentar baixa precipitação, altas doses de radiação ultravioleta e temperaturas (CARVALHO *et al.*, 2016; DUARTE, 2012; FERREIRA, 2014). Tal fato contribui ainda mais para o possível potencial biotecnológico da Caatinga, uma vez que estudos correlacionam organismos com nova diversidade química a fontes naturais que apresentam condições ambientais extremas (NICOLAU, 2016; RADDADI *et al.*, 2015; SÁNCHEZ-OTERO *et al.*, 2019).

Ainda destacando a forte influência dos fatores ambientais do semiárido na produção de antimicrobianos, o estudo de Charlop-Powers e colaboradores (2014) demonstrou uma frequente associação de microrganismos produtores de compostos bioativos à solos áridos. Como o semiárido brasileiro, apresenta características semelhantes a ecossistemas áridos, é possível que mecanismos de adaptação semelhantes possam estar presentes na microbiota edáfica da Caatinga, tornando-a um objeto de interesse para a investigação quanto a produção de compostos com potencial para bioprospecção. Embasando essa afirmação, estudos recentes já demonstraram a produção de enzimas e compostos com potencial antitumoral e com aplicação em diversos setores industriais (DA SILVA; DA SILVA; COELHO, 2019; MENDES-SILVA *et al.*, 2021).

No entanto, tal ecossistema vem sofrendo com a desertificação impulsionada pelo desmatamento promovido pelo setor agropecuário. Estudos já comprovam que tal processo é uma ameaça aos estoques de carbono da região e à biodiversidade da fauna, flora e do microbioma (DE ARAUJO FILHO *et al.*, 2018; DE CASTRO OLIVEIRA *et al.*, 2019). Diante desses fatos evidenciados, este trabalho contribui para expansão do conhecimento sobre o potencial biotecnológico das bactérias edáficas do semiárido brasileiro, proporcionando o destaque biotecnológico da região. Tal destaque pode agregar valor econômico ao ecossistema, atraindo olhares de investidores para pesquisas futuras. Dessa forma, haverá mais incentivos para o estabelecimento de medidas conservacionais, uma vez que é necessário que a microbiota, fonte biotecnológica, seja preservada para descobertas futuras e para o usufruto dos compostos bioativos.

Ainda, a descoberta de bactérias edáficas produtoras de antimicrobianos contribuirá no embasamento de pesquisas sobre antimicrobianos naturais de bactérias e pode levar ao desenvolvimento de novos antibióticos ou a potencialização de antibióticos já existentes. Dessa forma, reforçando a importância de compostos advindos de fontes naturais para a saúde humana, assim como, para a indústria farmacêutica.

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano de bactérias isoladas do solo do semiárido paraibano.

2.1 Objetivos Específicos

- Investigar a atividade antimicrobiana do líquido metabólico de isolados do filo Proteobacteria contra diferentes isolados clínicos;
- Investigar a atividade antimicrobiana do líquido metabólico de isolados do filo Actinobacteria contra diferentes isolados clínicos;
- Investigar a atividade antimicrobiana do líquido metabólico de isolados do filo Firmicutes contra diferentes isolados clínicos.
- Investigar a atividade antimicrobiana do conteúdo celular de isolados edáficos contra diferentes isolados clínicos.

3 METODOLOGIA

3.1 Isolados bacterianos

Foram avaliadas 60 bactérias de interesse pertencentes aos filos Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes (Tabela 1, 2 e 3, respectivamente). Tais bactérias foram isoladas de amostras de solo do semiárido no Estado da Paraíba como detalhado por Neves (2016) e Costa (2018), e são mantidas em suspensões de glicerol (20 %) a -20 °C junto a outros isolados bacterianos no Laboratório de Genética e Biotecnologia (LaGeB) do Centro de Ciências Sociais Aplicada da Universidade Estadual da Paraíba.

Tabela 1: Actinobactérias Edáficas Avaliadas Quanto a Atividade Antimicrobiana

IDENTIFICAÇÃO	CÓDIGO	IDENTIFICAÇÃO	CÓDIGO
<i>Leifsonia shinshuensis</i>	FT 1.18	<i>Micrococcus luteus</i>	FT 9.07
<i>Leifsonia shinshuensis</i>	FT 1.19	<i>Micrococcus luteus</i>	FT 9.10
<i>Leifsonia shinshuensis</i>	FT 1.20	<i>Micrococcus luteus</i>	FT 9.11
<i>Leifsonia shinshuensis</i>	FT 1.21	<i>Micrococcus luteus</i>	FT 9.12
<i>Kocuria palustris</i>	FT 7.27	<i>Micrococcus luteus</i>	FT 9.13
<i>Kocuria palustris</i>	FT 7.29	<i>Micrococcus luteus</i>	FT 9.15

Fonte: Elaborado pela autora;

Tabela 2: Isolados Edáficos de Firmicutes Avaliados Quanto a Atividade Antimicrobiana

IDENTIFICAÇÃO	CÓDIGO	IDENTIFICAÇÃO	CÓDIGO
<i>Staphylococcus warneri</i>	FT 1.16	<i>Bacillus cereus</i>	SJC 2.18
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	FT 5.16	<i>Bacillus thuringiensis</i>	SJC 2.29
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	FT 5.28	<i>Bacillus cereus</i>	SJC 2.8
<i>Bacillus megaterium</i>	FT 9.16	<i>Bacillus cereus</i>	SJC 5.11
<i>Staphylococcus warneri</i>	FT 9.17	<i>Bacillus cereus</i>	SJC 5.12
<i>Staphylococcus warneri</i>	FT 9.18	<i>Paenibacillus sp</i>	SJC 6.16
<i>Staphylococcus cohnii</i>	FT 9.30	<i>Paenibacillus sp</i>	SJC 6.20
<i>Bacillus cereus</i>	SJC 2.10	<i>Bacillus cereus</i>	SJC 7.10
<i>Bacillus megaterium</i>	SJC 2.12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SJC 7.11
<i>Bacillus cereus</i>	SJC 2.13	<i>Bacillus cereus</i>	SJC 7.29
<i>Bacillus cereus</i>	SJC 2.14	<i>Bacillus thuringiensis</i>	SJC 7.5
<i>Bacillus cereus</i>	SJC 2.15	<i>Bacillus cereus</i>	SJC 7.9
<i>Bacillus cereus</i>	SJC 2.16		

Fonte: Elaborado pela autora;

Tabela 3: Proteobactérias Edáficas Avaliadas Quanto a Atividade Antimicrobiana

IDENTIFICAÇÃO	CÓDIGO	IDENTIFICAÇÃO	CÓDIGO
<i>Enterobacter cloacae</i>	FT 1.07	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FT 5.26
<i>Burkholderia cepacia</i>	FT 1.11	<i>Burkholderia cepacia</i>	FT 7.22
<i>Providencia vermicola</i>	FT 1.22	<i>Enterobacter sp.</i>	SJC 2.21
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FT 5.01	<i>Enterobacter cloacae</i>	SJC 5.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FT 5.03	<i>Serratia marcescens</i>	SJC 5.14
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FT 5.04	<i>Enterobacter cloacae</i>	SJC 5.16
<i>Comamonas sp.</i>	FT 5.05	<i>Enterobacter cloacae</i>	SJC 5.18
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FT 5.06	<i>Enterobacter cloacae</i>	SJC 5.20
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FT 5.08	<i>Enterobacter cloacae we zhecch</i>	SJC 5.22
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FT 5.12	<i>Enterobacter cloacae</i>	SJC 5.24
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FT 5.18	<i>Enterobacter cloacae</i>	SJC 5.30
<i>Comamonas terrae</i>	FT 5.25		

Fonte: Elaborado pela autora;

3.2 Microrganismos teste

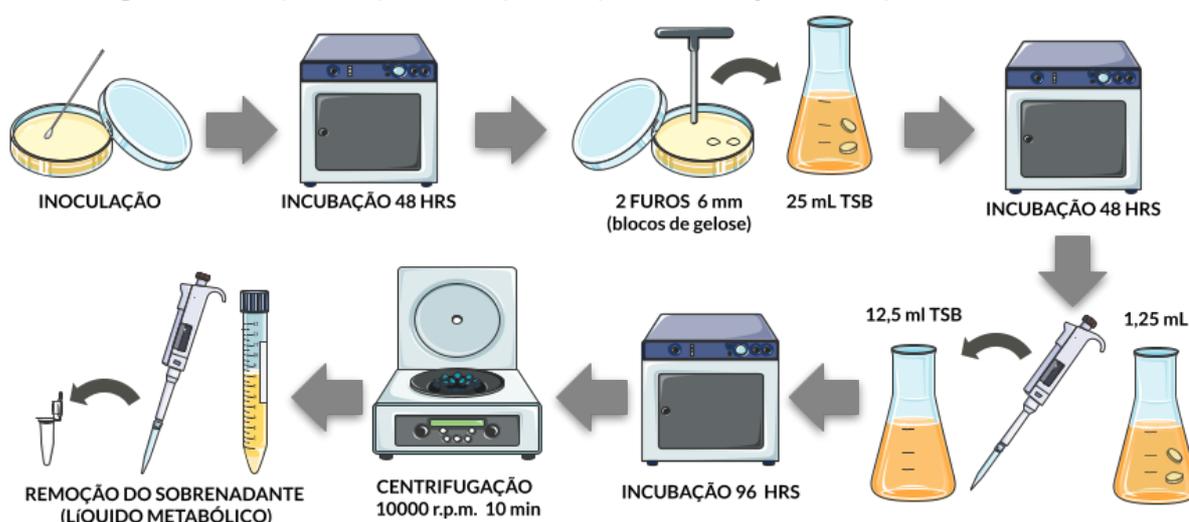
Foi avaliada atividade antagônica do líquido metabólico dos isolados bacterianos frente a *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* CBAM 0332, *Aeromonas hydrophila* CBAM 0173 disponibilizadas pelo Departamento de Microbiologia de Alimentos/UFPB e Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia – BioGeR/UFPB. Adicionalmente, foi avaliada a atividade contra *Staphylococcus aureus*, cedida por um laboratório de análises clínicas. Todas as bactérias patogênicas foram cultivadas em meio TSB, suplementado com ágar a 1,5%, a 37°C, sendo conservadas em suspensões de glicerol (20 %) a -20 °C, renovadas a cada ano.

3.3 Obtenção do líquido metabólico

A obtenção do líquido metabólico teve como base a preparação do pré-inóculo e inóculo adaptado de Ferreira (2012). Para produção do pré-inóculo, os isolados bacterianos foram inoculados em uma placa de petri contendo meio TSB, suplementado com ágar a 1,5%, e incubados por 48 horas a 37°C, para o crescimento celular em toda a placa. Em seguida, foram confeccionados, com auxílio de um furador esterilizado, blocos circulares de 6 mm de diâmetro (blocos de gelose). Destes, dois foram transferidos para erlenmeyer de 125ml, contendo 25 ml do meio de cultura líquido TSB, e incubados novamente por 48 horas (Figura 1).

Então, uma alíquota de 1,25 mL do pré-inóculo (10% do volume final) foi transferida para erlenmeyers contendo 12,5 mL de meio de cultura líquido. Em seguida tal solução foi incubada por 96 horas. Para separação do sobrenadante e da biomassa celular, esse cultivo foi centrifugado por 10 minutos a 4000 r.p.m, e então a parte do sobrenadante foi reservada para evitar possíveis contaminações celulares, obtendo-se assim o líquido metabólico (Figura 2).

Figura 2: Esquema passo-a-passo para obtenção do líquido metabólico



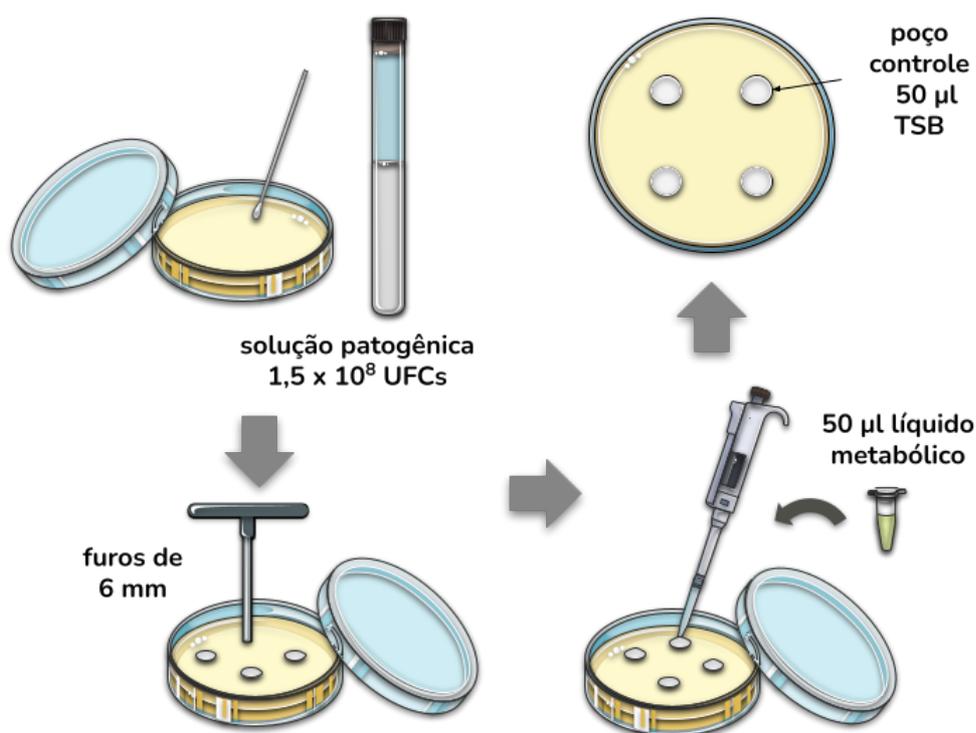
Fonte: Vetores modificados, obtidos em smart.servier.com/

3.4 Método de difusão em poço

O líquido metabólico obtido de cada isolado bacteriano foi avaliado quanto ao potencial antimicrobiano através do método de difusão em poço adaptado de Alaqeel e colaboradores (2021).

Para a realização do teste, foram confeccionados furos(poços) de 6 mm de diâmetro com o auxílio de ponteiros estéreis de 200 μL , no meio de cultura sólido previamente inoculado com uma solução do microrganismo teste na escala 0,5 McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, 50 μL do líquido metabólico foram injetados em cada poço, sendo deixados em repouso, em temperatura ambiente por 20 minutos, para a difusão do líquido (Figura 3). Foram realizados testes em triplicatas, com o adicional de um poço contendo apenas o meio líquido de cultura como controle negativo, permitindo analisar a possibilidade da atividade positiva advir do meio de cultivo.

Figura 3: Esquema do Método de Difusão em Poço



Fonte: Vetores modificados, obtidos em smart.servier.com/

Por fim as placas contendo o líquido metabólico e o microrganismo teste foram incubadas à 37 °C e observadas por 24 horas, ou até que o microrganismo teste tenha crescido por toda a placa, permitindo assim a visualização da zona (halo) de inibição, em caso de atividade antimicrobiana positiva. Tais halos tiveram seu diâmetro aferido a partir de um paquímetro digital, em seguida a média aritmética dos resultados em triplicata foi realizada para, então, classificar a atividade antimicrobiana do isolado, com base na classificação de Matsuura (2004) (Tabela 4).

Tabela 4: Classificação da atividade antimicrobiana

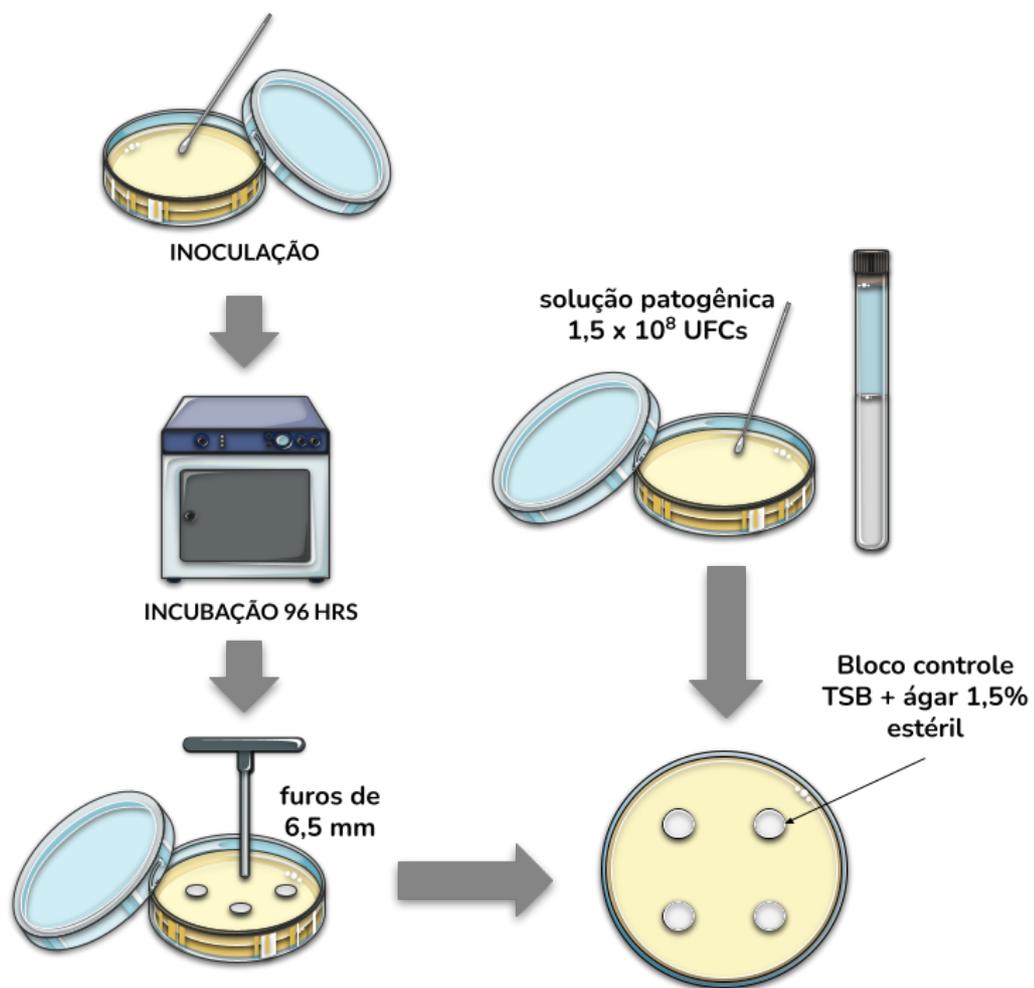
Categoria de atividade antimicrobiana	Halo de inibição médio(mm)
Inerte	< 7
Baixa	7 - 10
Moderada	11 - 14
Alta	> 14

Fonte: Adaptado de Matsuura (2004)

3.5 Método bloco de gelose

O procedimento de realização do experimento foi baseado em Ichikawa, Ishikura e Ozaki (1971). Primeiramente as bactérias de interesse foram cultivadas em placas contendo meio TSB, suplementado com ágar a 1,5%, por 96 horas a 37°C. Desse cultivo foram removidos blocos cilíndricos de 6,5 mm de diâmetro (blocos de gelose), os quais foram transferidos para as placas previamente inoculadas com os microrganismos teste na concentração equivalente a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), de modo que o cultivo da bactéria teste fique em contato com a superfície do meio sólido. Foram feitos testes em triplicatas, com o adicional de um bloco de gelose estéril como controle negativo (Figura 4). Finalmente, as placas contendo os blocos de gelose e o microrganismo teste foram incubadas à 37 °C e observadas por 24 horas. Em caso de atividade antimicrobiana positiva, o halo de inibição foi mensurado e a atividade antimicrobiana do isolado foi classificada de acordo com a Tabela 4.

Figura 4: Esquema do Método Bloco de Gelose



Fonte: Vetores modificados, obtidos em smart.servier.com/

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise do líquido metabólico

O líquido metabólico de 56 isolados avaliados não demonstrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *S. enteritidis* e *S. typhimurium*. Esse resultado pode ser fruto da estratégia de análise do potencial antimicrobiano a partir do líquido metabólico, em que as moléculas bioativas podem se encontrar mais diluídas, desse modo, atenuando a atividade antimicrobiana. Sendo assim, é possível que o extrato bruto dos isolados avaliados neste trabalho se mostre ativo. Makuwa e Serepa-Dlamini (2021) detectaram a atividade antibacteriana dos extratos de isolados dos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas* frente a *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O extrato do pigmento de espécies de *Micrococcus*, em especial, *M. luteus*, demonstrou ser ativo contra *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *Aspergillus flavus* e *A. niger* (KARBALAEI-HEIDARI; PARTOVIFAR; MEMARPOOR-YAZDI, 2020; NISHA *et al.*, 2020).

A ação antifúngica de isolados dos gêneros *Bacillus*, *Stenotrophomonas* e *Kocuria* já foi constatada contra fungos fitopatogênicos (AKTAS *et al.*, 2022; GOMAA, 2012; HASHEM *et al.*, 2021; ROJAS-SOLÍS *et al.*, 2018; SETIAWAN *et al.*, 2022). Romanenko e colaboradores (2020) detectaram a atividade antimicrobiana de *Paenibacillus tundrae* frente a *E. faecium*, *Xanthomonas badrii* e *C. albicans*. Dessa forma, ainda não é possível afirmar a inexistência de atividade antimicrobiana do líquido metabólico dos isolados avaliados, pois é possível haver atividade microbiana contra outras bactérias e fungos não utilizadas nesse trabalho, como *E. faecium*, *X. bradii*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, entre outros.

Ainda, é necessário levar em conta as condições experimentais, as quais são determinantes para a detecção da atividade antimicrobiana. O estudo de Phonghanpot e Jarintanan (2022) é um exemplo claro da influência das condições experimentais. Nesse estudo foram detectados 3 metabólitos de *Staphylococcus sp.* e *M. luteus* capazes de inibir *S. aureus* ATCC 25923 apenas quando seus extratos brutos foram preparados a partir de co-culturas. O

O trabalho de Martínez-Cardeñas e colaboradores (2012) verificou que a produção de bacteriocinas de *B. thuringiensis* é aprimorada quando o isolado é co-cultivado com *B. cereus*, mas, também é influenciada pelo meio de cultivo, pH, temperatura e agitação. Logo, avaliar outras condições de cultivo para a obtenção do líquido metabólico pode ser objetivo de pesquisas futuras.

Fatores como limitação de nutrientes e compostos produzidos pela bactéria antagonista podem interferir na atividade do composto antimicrobiano (SLATTERY; RAJBHANDARI; WESSON, 2001; WESTHOFF *et al.*, 2021). Estudos mostram que a própria molécula antimicrobiana em si, em concentrações subinibitórias, é capaz de gerar respostas transcricionais em bactérias receptoras, podendo assim levar a produção de compostos bioativos nessas bactérias (DAVIS; RAYAN, 2012; MULLIS *et al.*, 2019)

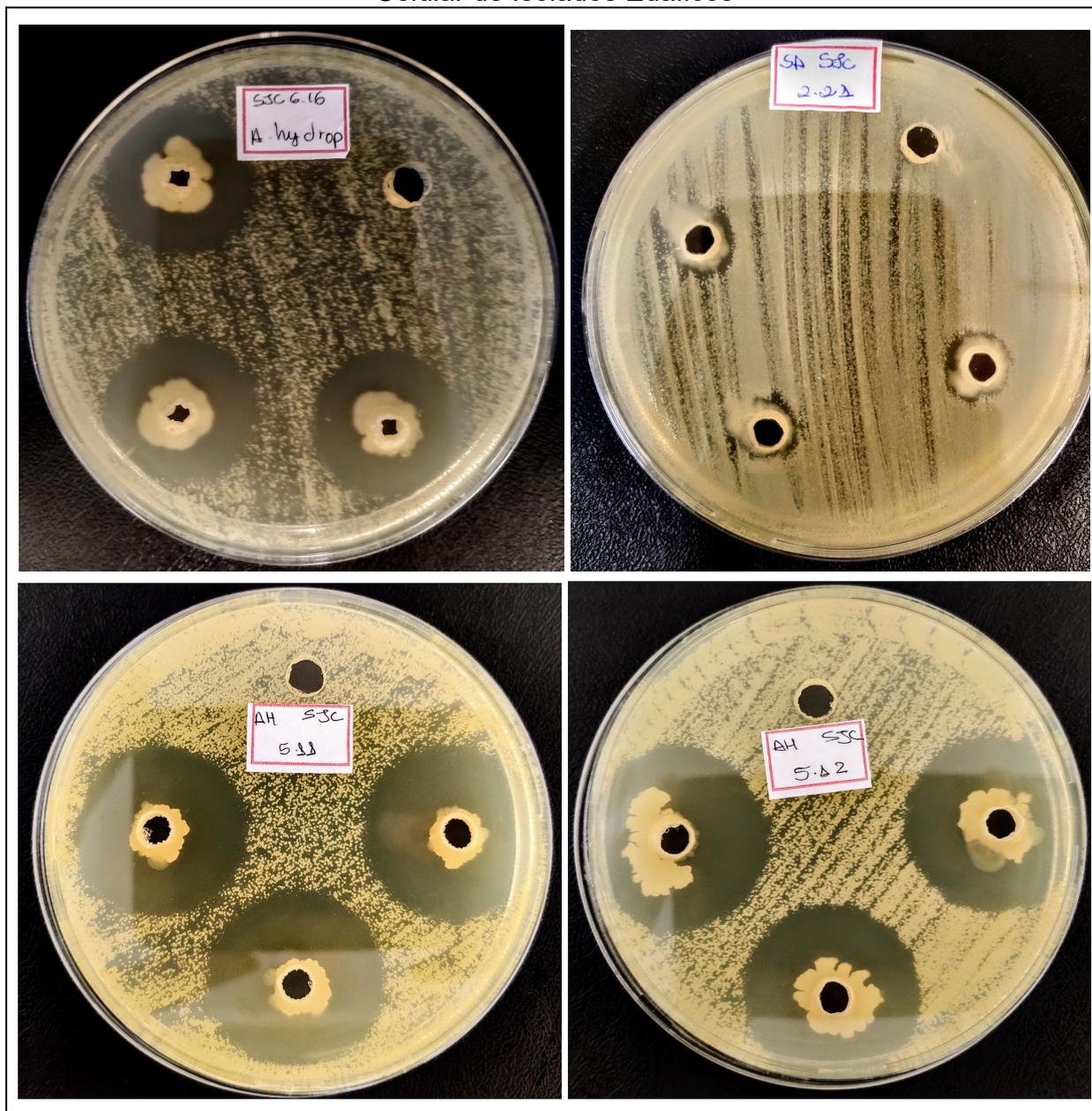
Assim como, a fase de crescimento da cultura bacteriana em que o líquido metabólico é coletado afeta a diretamente sua atividade antimicrobiana, uma vez que os compostos liberados em uma fase anterior podem ser degradados por compostos liberados na fase seguinte (LERTCANAWANICHAKUL; SAWANGNOP, 2011). Segundo Lewis (2017), a produção de antimicrobianos geralmente atinge seu pico próximo à fase estacionária. Portanto, ter o conhecimento prévio da curva de crescimento da bactéria a ser testada para a confecção de protocolos de obtenção do líquido metabólico pode facilitar a busca por antimicrobianos.

Uma alternativa para solucionar o problema da interferência da fase de crescimento pode ser avaliar o conteúdo celular, pois os compostos serão difundidos no meio logo em seguida a sua liberação, evitando sua degradação e permitindo a testagem de todos os compostos liberados. Entretanto, é possível que o co-cultivo induza a atividade antimicrobiana, não sendo uma produção espontânea do antimicrobiano, já que substâncias liberadas pela bactéria patogênica podem ativar vias biossintéticas na bactéria em estudo (bactéria de interesse) (WESTHOFF *et al.*, 2021). Logo, é interessante utilizar mais de um método de detecção, a fim de eliminar dúvidas sobre a produção do antimicrobiano.

Durante a realização dos experimentos de difusão em poço foi detectada atividade inibitória apenas em experimentos com contaminações celulares dos isolados SJC 2.21, SJC 5.11 e SJC 5.12 e SJC 6.16 (Figura 5). Em tais

experimentos a fase celular não foi separada completamente da fase líquida, apesar de sucessivas centrifugações e visualmente parecer livre de contaminações celulares. Por essa razão foi realizada a análise da atividade antimicrobiana do conteúdo celular desses isolados através do método de bloco de gelose.

Figura 5: Atividade Antimicrobiana do Líquido Metabólico com Contaminação Celular de Isolados Edáficos



Fonte: produzida pela autora;

4.2 Análise pelo método de bloco de gelose

Foi registrada a atividade antimicrobiana positiva dos isolados: SJC 6.16 (*Paenibacillus sp*) contra *A. hydrophila* e *S. Enteritidis* (Figura 6), SJC 2.21 (*Enterobacter sp*) contra *S. aureus* e *A. hydrophila* (Figura 7), SJC 5.11 (*B. cereus*) contra *S. aureus*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. enteritidis* (Figura 8), SJC 5.12 (*B. cereus*) contra os mesmos isolados de SJC 5.11, com exceção de *S. Enteritidis* (Figura 9). O diâmetro do halo médio de cada atividade positiva pode ser visualizado na tabela 5.

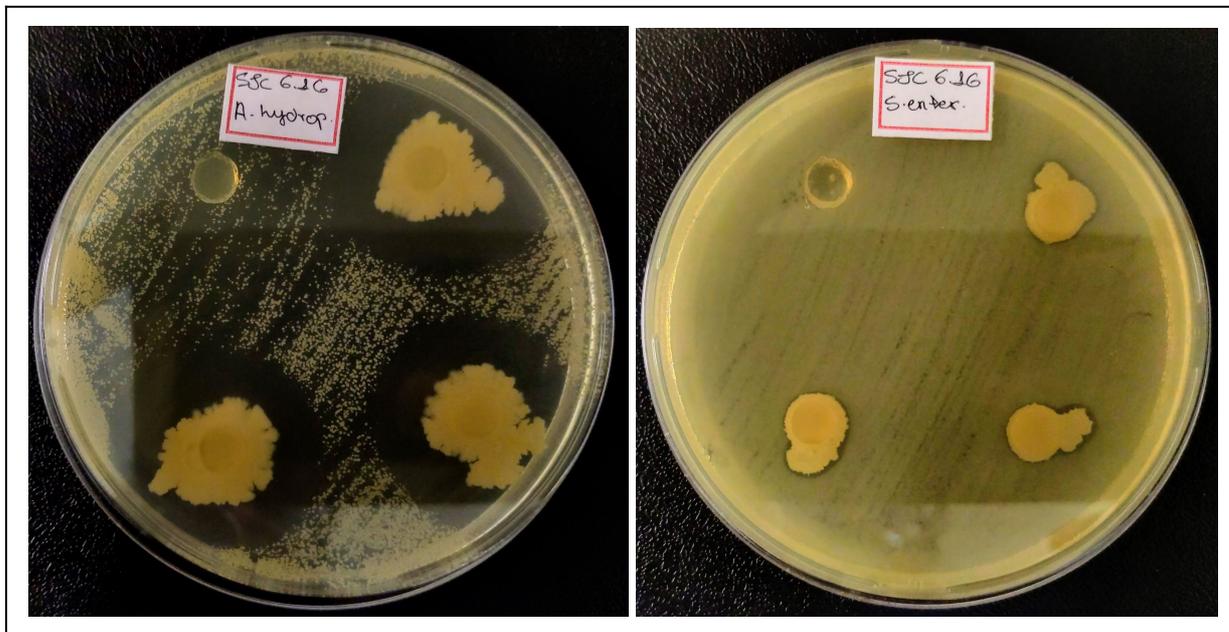
Tabela 5: Atividade Antimicrobiana de Isolados Edáficos Avaliados pelo Método de Bloco de Gelose

IDENTIFICAÇÃO	CÓDIGO	HALO MÉDIO (mm)					
		SA	KP	AH	EC	SE	ST
<i>Paenibacillus sp</i>	SJC 6.16	-	-	32,82	-	9,51	-
<i>Enterobacter sp.</i>	SJC 2.21	15,07	-	15,99	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	SJC 5.11	22,82	-	27,39	8,6	10,51	9,78
<i>Bacillus cereus</i>	SJC 5.12	27,7	-	26,88	10,91	-	9,83

Fonte: produzida pela autora; SA: *S. aureus* clínica, KP: *K. pneumoniae* CBAM 0332, AH: *A. hydrophila* CBAM 0173, EC: *E. coli* ATCC 8739, SE: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, ST: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

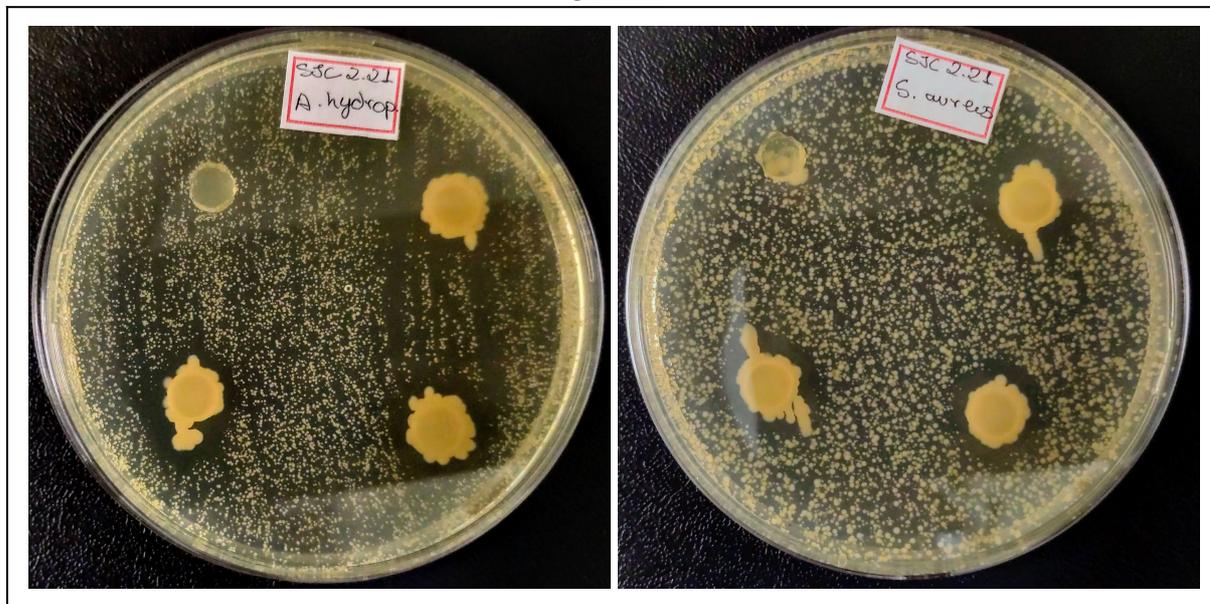
Os isolados SJC 2.21, SJC 5.11 e SJC 5.12 apresentaram atividade antimicrobiana alta contra *S. aureus* e *A. hydrophila*, enquanto o isolado SJC 6.16 apenas contra *A. hydrophila*, segundo a classificação de Matsuura (2004). Os isolados SJC 5.11 e SJC 5.12, apresentaram atividade baixa contra *E. coli* e *S. typhimurium*, assim como o isolado SJC 6.16 e o SJC 5.11 frente a *S. enteritidis*. Sendo assim, o presente trabalho será continuado com a análise do extrato bruto destes isolados, e posterior identificação do metabólito bioativo.

Figura 6: Halos de Inibição do Isolado SJC 6.16 Avaliado pelo Método de Bloco de Gelose



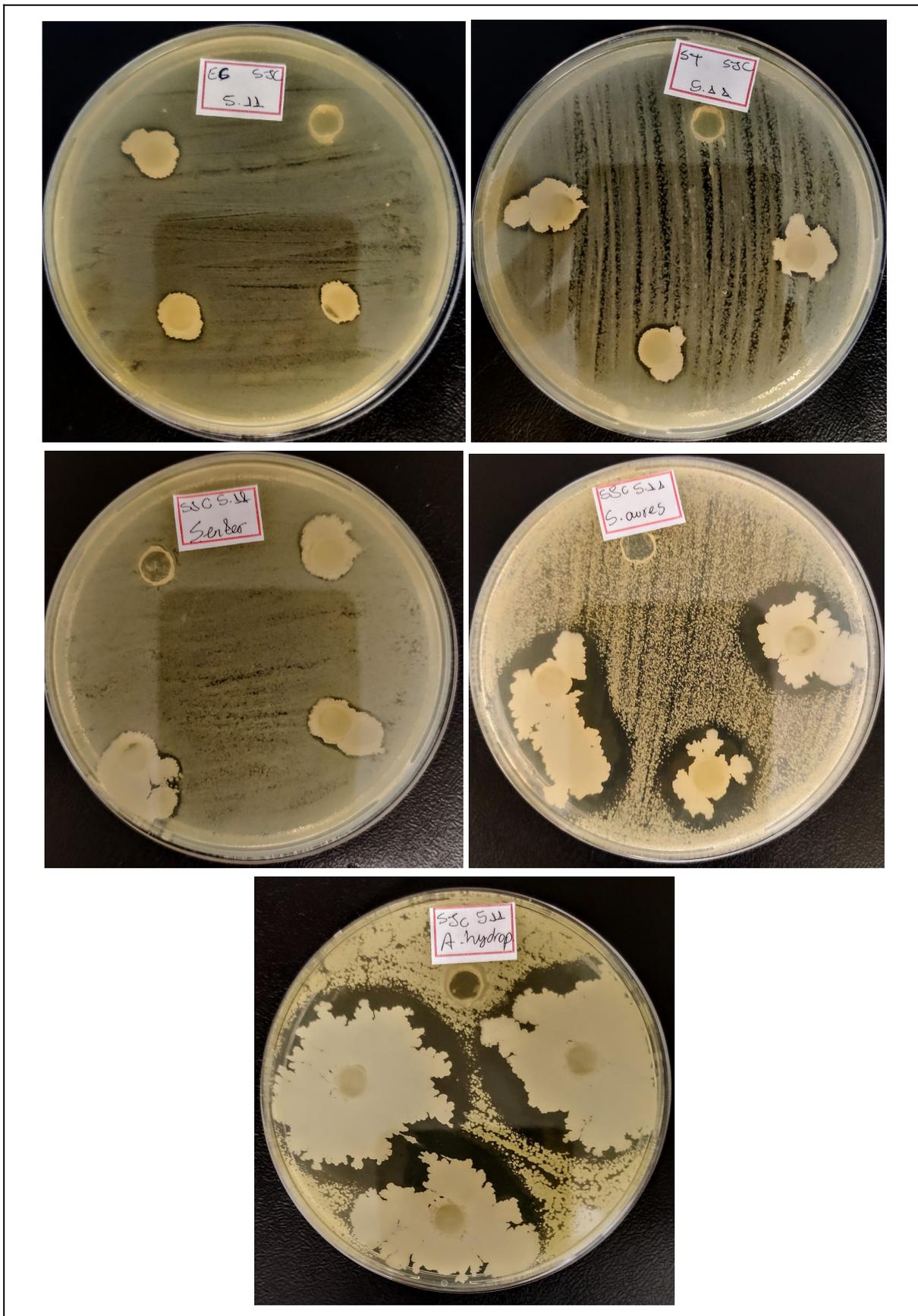
Fonte: produzida pela autora;

Figura 7: Halos de Inibição do Isolado SJC 2.21 Avaliado pelo Método de Bloco de Gelose



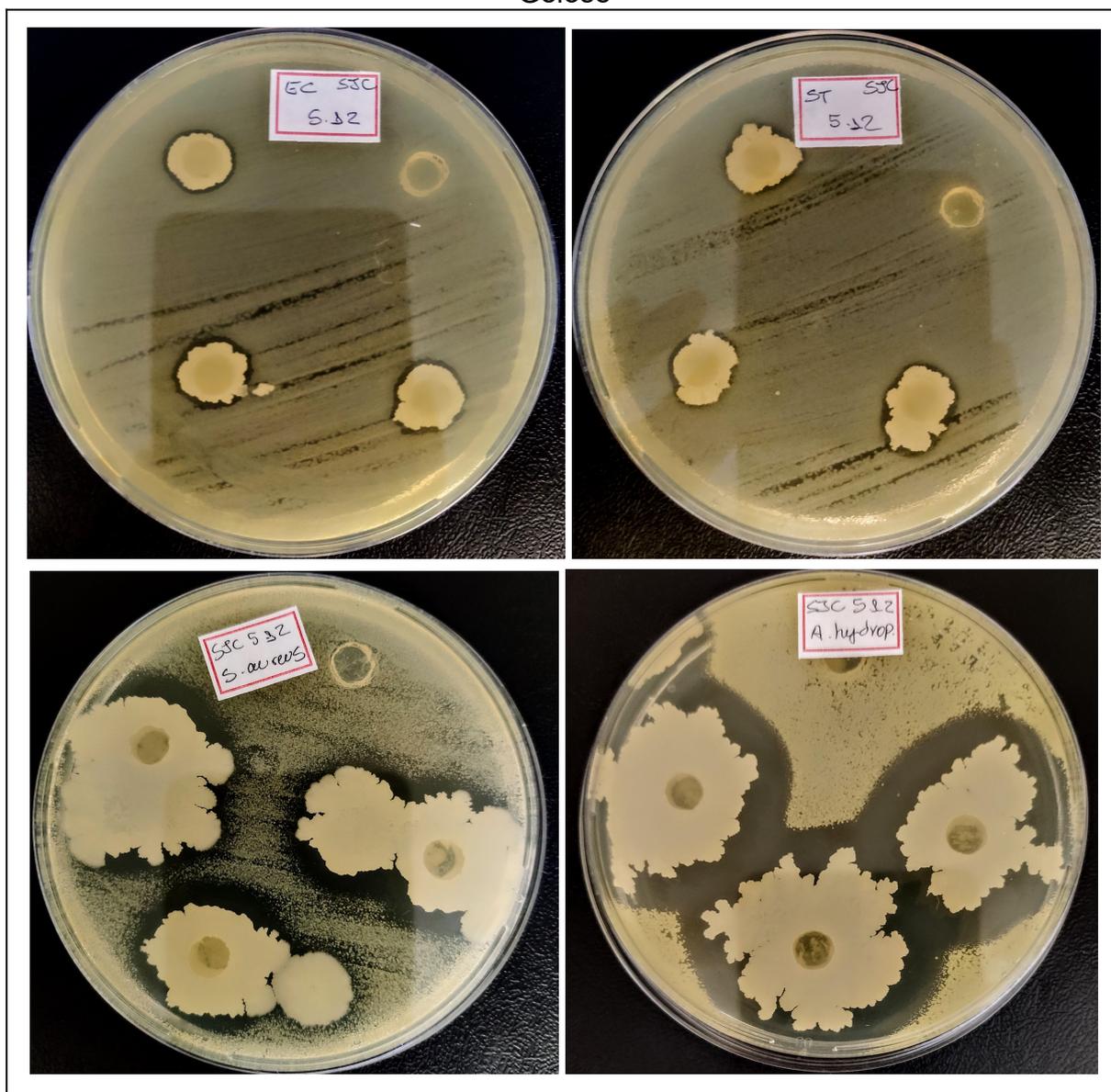
Fonte: produzida pela autora;

Figura 8: Halos de Inibição do Isolado SJC 5.11 Avaliado pelo Método de Bloco de Gelose



Fonte: produzida pela autora;

Figura 9: Halos de Inibição do Isolado SJC 5.12 Avaliado pelo Método de Bloco de Gelose



Fonte: produzida pela autora;

Os resultados positivos de *Paenibacillus* convergem com os resultados registrados por Alkotaini e colaboradores (2014), os quais constataram a produção de um peptídeo antimicrobiano intracelular em um isolado de *Paenibacillus alvei* contra *E. coli*, *S. Enteritidis*, *B. cereus* e *Lactobacillus delbrueckii*. Chen, Liu e Hu (2019) também detectaram a produção de um composto semelhante a bacteriocina por *Paenibacillus ehimensis*, com atividade contra *A. hydrophila*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, entre outros patógenos.

A atividade antimicrobiana de isolados do gênero de *Enterobacter* também é corroborada por diversos estudos, como a atividade antagônica frente às bactérias *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus sp*; e aos fungos patogênicos, *C. albicans*, *A. flavus*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma horzianum*, entre outros (GONG *et al.*, 2019; GOPI *et al.*, 2012; GUPTA; RANA, 2018; HAMEED; ABBAS; HAMEED, 2018; KHALIFA *et al.*, 2016).

Além disso, Shastry, Rekha e Rai (2019) relataram a capacidade de isolados endofíticos de *Enterobacter* em inibir a formação de biofilme de *A. hydrophila* e *P. aeruginosa*, indicando um potencial farmacológico, uma vez que a inibição do biofilme dificulta o estabelecimento dessas bactérias no meio, dificultando a propagação da infecção e, dessa forma atenuando a virulência desses patógenos.

Estudos anteriores já demonstraram que *B. cereus* também apresentou atividade frente a diversos patógenos como, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *A. hydrophila* e *P. aeruginosa* (BASIT *et al.*, 2018; FELIATRA *et al.*, 2021; SEERANGARAJA *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2019). A atividade inibitória do biofilme de *B. cereus* contra *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* também foi detectada por Sriram e colaboradores (2011).

A resistência à antimicrobianos em cepas de *S. aureus* e *A. hydrophila* vem sendo continuamente relatada e, cada vez mais, tem se buscado compreender este fenômeno nessas espécies (CONG; YANG; RAO, 2020; YU *et al.*, 2021). Diante disto, é de extrema importância para prática clínica a busca por novas estratégias de tratamento contra tais patógenos resistentes, como a descoberta de novos compostos bioativos com ação antimicrobiana, de forma a possibilitar o desenvolvimento de novos antibióticos. A OMS já preconiza a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos para as cepas MDR de *S. aureus*, *E. coli* e bactérias da família Enterobacteriaceae, como *Salmonella sp.* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Nesse sentido, destaca-se que patógenos destas espécies foram inibidos pelas bactérias edáficas bioativas aqui estudadas, logo os compostos produzidos por tais isolados podem possuir ação contra linhagens resistentes. Dessa forma, trabalhos futuros podem analisar a atividade do extrato desses isolados frente a linhagens resistentes.

Além da aplicação no desenvolvimento de novos antibióticos, os isolados bioativos detectados neste trabalho podem ser aplicados na produção de probióticos. A atividade antagônica detectada sugere que os isolados bioativos, principalmente de *Bacillus*, podem desempenhar um papel na exclusão competitiva de patógenos, como *Salmonella*, dessa forma protegendo o organismo contra infecções intestinais e contribuindo para uma microbiota mais diversa e saudável (KHOCHAMIT *et al.*, 2020).

Segundo a revisão de Lee, Kim e Paik (2019) os esporos de *B. cereus* podem se aderir mais eficientemente às células epiteliais humanas devido à sua hidrofobicidade do que esporos de outras espécies de *Bacillus*, desse modo, favorecendo sua atividade probiótica. Os mesmos autores também relatam que probióticos de *B. cereus* para humanos já são comercializados atualmente. Assim, esses fatos embasam a investigação sobre o potencial probiótico dessas bactérias, a qual pode ser realizada em estudos futuros.

O método de bloco de gelose se mostrou eficiente para análise da atividade celular, detectando uma atividade antimicrobiana mais ampla dos isolados SJC 5.11 e 5.12, em comparação com a avaliação pelo método de difusão em poço. Isso deve-se, provavelmente, ao fato do método de bloco de gelose enfatizar relações antagônicas (ARMENGOL; HARMANCI; LAFFLEUR, 2021). Como os organismos são colocados em contato direto nesse método, é possível que a atividade antagônica observada seja derivada de mecanismos inibitórios dependentes de contato (GRANATO; MEILLER-LEGRAND; FOSTER, 2019).

A utilização apenas do líquido metabólico, no método de difusão em poço, impede que a atividade derivada desse tipo de mecanismo seja detectada. Assim, é notado que cada técnica apresenta sua peculiaridade, de modo que, frequentemente, ambas técnicas são utilizadas para a triagem do potencial antimicrobiano (ASHOK *et al.*, 2020; BOTTA *et al.*, 2020; CAMPOS *et al.*, 2019; LUTI, 2020).

O conhecimento da origem de produção do composto bioativo é útil para a avaliação futura do extrato dos isolados, permitindo a economia de insumos na produção do extrato. Pois o solvente utilizado para extração do composto bioativo varia de acordo com sua localização, devido a necessidade de lise da parede e

membrana celular para o acesso ao composto, no caso de compostos bioativos intracelulares (MOHANRAJ *et al.*, 2011).

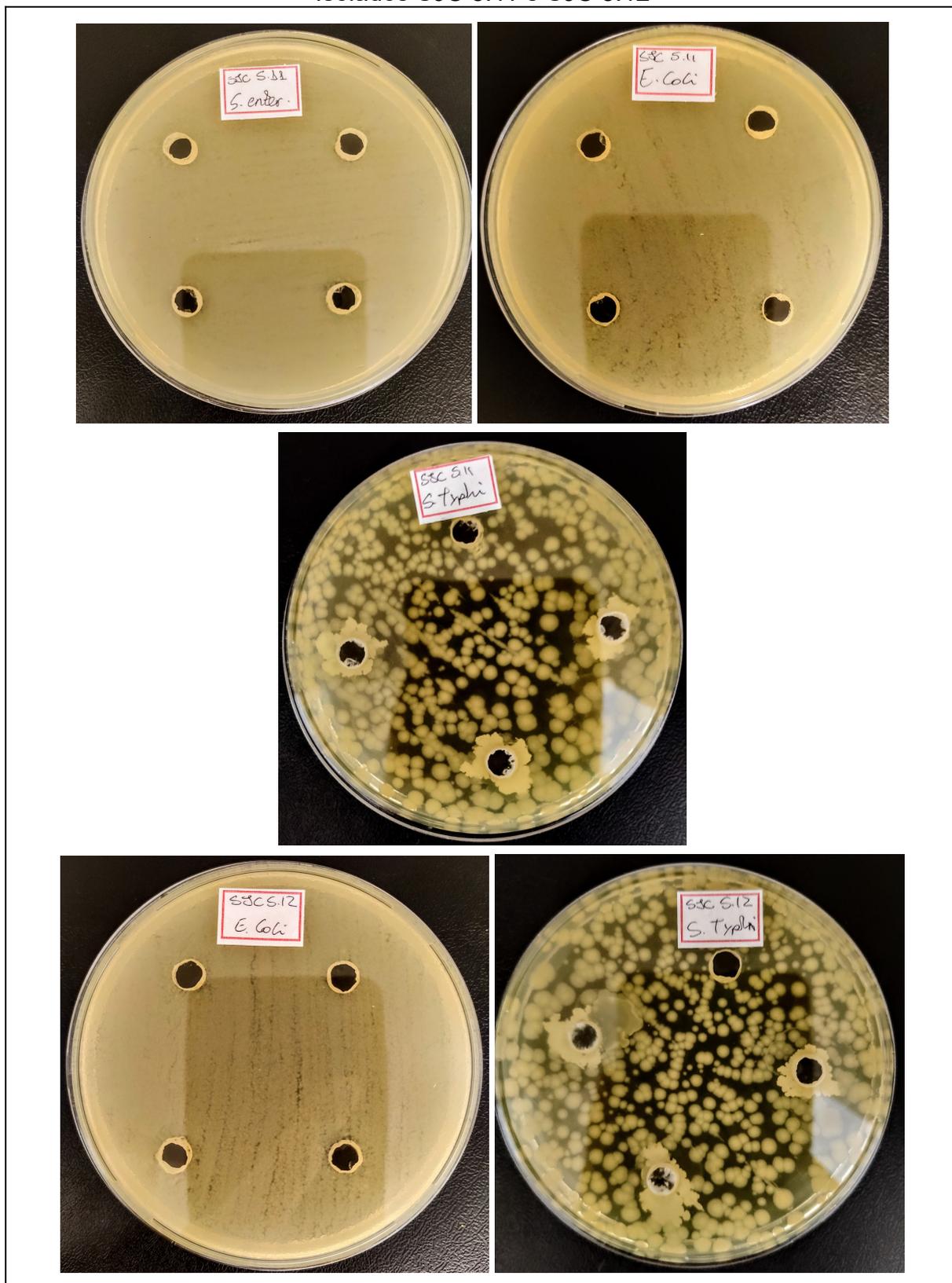
O método de bloco de gelose por si só não diferencia a origem de produção do composto bioativo, uma vez que, a avaliação do conteúdo celular implica na detecção de compostos retidos e secretados. Assim, para a localização do composto é necessário a utilização de metodologias adicionais que avaliem apenas compostos secretados. Arena e colaboradores (2019) e Mohanraj e colaboradores (2011) utilizaram o método de bloco de gelose associado ao método de difusão em poço para determinar a localização do composto bioativos de seus isolados avaliados.

Portanto, levando em conta o exposto, os resultados positivos da avaliação do conteúdo celular dos isolados SJC 5.11 e 5.12 frente a *E. coli*, *S. enteritidis* e *S. typhimurium* (Figura 8 e 9), em detrimento dos resultados negativos do líquido metabólico (Figura 10), indicam a produção de um composto antibacteriano intracelular por esses isolados. Dessa forma, sugere-se que a utilização de duas metodologias que avaliem elementos bacterianos distintos (líquido metabólico e conteúdo celular) é de suma importância para a detecção e localização (intra ou extracelular) de compostos antimicrobianos.

No entanto, a origem do composto antimicrobiano desses isolados ativos contra a *A. hydrophila* e *S. aureus* ainda é incerta, uma vez que não foi possível realizar experimentos em que o líquido metabólico não apresentasse contaminações por células bacterianas. Assim, é possível que tais isolados produzam tanto compostos antimicrobianos intracelulares e extracelulares.

O mesmo pode ser afirmado para o composto antimicrobiano de SJC 6.16 e SJC 2.21, cujos experimentos de difusão em poço também apresentaram contaminações celulares, mesmo após sucessivas centrifugações. Com isso, é necessário realizar a obtenção do extrato bruto da fase celular e líquida de todos os isolados ativos, para assim, identificar a origem de produção do composto antimicrobiano.

Figura 10: Atividade Antimicrobiana Negativa do Líquido Metabólico dos Isolados SJC 5.11 e SJC 5.12



Fonte: produzida pela autora;

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos é possível sugerir que o líquido metabólico de isolados de Actinobacteria testados não apresentam atividade antibacteriana contra as cepas patógenas avaliadas nas condições desenvolvidas neste trabalho.

Apenas o conteúdo celular dos isolados de Proteobacteria (SJC2.21 - *Enterobacter sp*) e Firmicutes (SJC 6.16 - *Paenibacillus sp.*, SJC 5.11 e SJC 5.12 - *Bacillus cereus*) demonstrou atividade antibacteriana. Tais resultados indicam uma possível produção de compostos antibacterianos intracelulares por esses isolados.

No entanto, o potencial antimicrobiano do líquido metabólico desses isolados ainda demanda mais estudos, podendo ser analisado futuramente a partir da análise do extrato bruto da fase líquida desses isolados. Trabalhos futuros podem ser realizados avaliando o extrato bruto desses isolados frente a cepas resistentes desses microrganismos teste, como também podem buscar o aprimoramento da atividade antimicrobiana avaliando outras condições de cultivo.

O conteúdo celular de isolados de *B. cereus* se mostrou ativo contra uma gama maior de patógenos, sendo candidatos promissores para descoberta de moléculas antibacterianas de amplo espectro.

A utilização de diferentes metodologias dependentes de cultura foi crucial para a detecção eficiente da atividade antimicrobiana, o que serve de indicação para trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

ABERA, Solomon. The Potential of Biotechnology on Soil Quality by Minimizing Agrochemical Impact to Ensure Sustainable Agriculture-A Review. **Strategies and Tools for Pollutant Mitigation**, p. 405-430, 2021.

ABINANDAN, Sudharsanam *et al.* Soil microalgae and cyanobacteria: the biotechnological potential in the maintenance of soil fertility and health. **Critical reviews in biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 981-998, 2019.

AHMAD, Iqbal *et al.* Environmental antimicrobial resistance and its drivers: A potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 101-111, 2021.

AKTAS, Cigdem *et al.* Purification and Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* Chitinase with Antifungal and Insecticidal properties. 2022.

AL-AMOUDI, Soha *et al.* Bioprospecting Red Sea coastal ecosystems for culturable microorganisms and their antimicrobial potential. **Marine drugs**, v. 14, n. 9, p. 165, 2016.

ALAQEEL, Shatha Ibrahim *et al.* Antimicrobial activities of novel class of spirooxindole pyrrolidine grafted indanedione hybrid heterocycles against carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* (CKP). **Journal of infection and public health**, v. 14, n. 12, p. 1870-1874, 2021.

ALIERO, Adamu Almustapha *et al.* Molecular Characterization and optimization of Bioactive Compounds Production of three Actinomycetes spp Isolated from Waste Dump Soil from Western Uganda. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 12, n. 3, p. 244-230, 2018.

ALKOTAINI, Bassam *et al.* Isolation and identification of a new intracellular antimicrobial peptide produced by *Paenibacillus alvei* AN5. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 1377-1385, 2014.

ARENAS, Rio Janina B. *et al.* Antimicrobial Activity of Endophytic and Rhizospheric Fungi Associated with Soft Fern (*Christella* sp.) and Cinderella Weed (*Synedrella nodiflora*) Inhabiting a Hot Spring in Los Baños, Laguna, Philippines. **Acta Medica Philippina**, v. 56, n. 10, 2022.

ARMENGOL, Eva Sanchez; HARMANCI, Melisa; LAFFLEUR, Flavia. Current strategies to determine antifungal and antimicrobial activity of natural compounds. **Microbiological Research**, v. 252, p. 126867, 2021.

ASHOK, Alka *et al.* AntiMycobacterial activity of endophytic actinobacteria from selected medicinal plants. **Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)**, v. 4, n. 3, p. 193, 2020.

ASSAD, Beatriz M. *et al.* Endophytic actinobacteria of *Hymenachne amplexicaulis* from the Brazilian Pantanal wetland produce compounds with antibacterial and antitumor activities. **Microbiological research**, v. 248, p. 126768, 2021.

BALOUIRI, Mounyr *et al.* Antifungal activity of *Bacillus* spp. isolated from *Calotropis procera* AIT. Rhizosphere against *Candida albicans*. **Asian J. Pham. Clin. Res**, v. 8, p. 213-217, 2015.

BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal Of Pharmaceutical Analysis**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 71-79, abr. 2016.

BASIT, Madiha *et al.* Biosurfactants production potential of native strains of *Bacillus cereus* and their antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 31, 2018.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966

BIBI, Fehmida *et al.* Diversity and antagonistic potential of bacteria isolated from marine grass *Halodule uninervis*. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

BOTTA, Lorenzo *et al.* Production and identification of two antifungal terpenoids from the *Posidonia oceanica* epiphytic Ascomycota *Mariannaea humicola* IG100. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2020.

BUIJS, Yannick *et al.* Marine Proteobacteria as a source of natural products: advances in molecular tools and strategies. **Natural product reports**, v. 36, n. 9, p. 1333-1350, 2019.

CAMPOS, Ron Patrick C. *et al.* Mycopharmacological properties of endophytic fungi isolated from Cuban Oregano (*Plectranthus amboinicus* Lour.) leaves. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, v. 8, n. 3, p. 103-110, 2019.

CARVALHO, R.M.M. *et al.* Bactérias solubilizadoras de fosfato em solo rizosférico da Caatinga. **Revista Geonorte**, v. 7, n. 26, p. 48 - 60, 2016

CHANDRA, Niharika; KUMAR, Sunil. Antibiotics producing soil microorganisms. In: **Antibiotics and antibiotics resistance genes in soils**. Springer, Cham, 2017. p. 1-18.

CHARLOP-POWERS, Zachary *et al.* Chemical-biogeographic survey of secondary metabolism in soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 10, p. 3757-3762, 2014.

CHEN, Sai-Wei; LIU, Chun-Hung; HU, Shao-Yang. Dietary administration of probiotic *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 with bacteriocin-like activity improves growth performance and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* in

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & shellfish immunology**, v. 84, p. 695-703, 2019.

CONG, Yanguang; YANG, Sijin; RAO, Xiancai. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169-176, 2020.

COSTA, R.F.F. **Diversidade genética de bactérias edáficas em duas áreas de proteção ambiental do semiárido paraibano**. 2018. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2018.

DA SILVA, Iasmim Lucas; DA SILVA, Leonor Alves de Oliveira; COELHO, Luana Cassandra Breitenbach Barroso. The Brazilian Caatinga Biome and Its Biotechnological Potential. **Advances in Applied Science and Technology Vol. 5**, p. 123-142, 2019.

DAVIES, Julian; RYAN, Katherine S. Introducing the parvome: bioactive compounds in the microbial world. **ACS chemical biology**, v. 7, n. 2, p. 252-259, 2012.

DEMAIN, Arnold L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 185-201, 2014.

DEPOORTER, Eliza *et al.* Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 100, n. 12, p.5215-5229, 26 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

DESRIAC *et al.* Antimicrobial peptides from marine proteobacteria. **Marine drugs**, v. 11, n. 10, p. 3632-3660, 2013.

DRISSI, Fatima *et al.* Common occurrence of antibacterial agents in human intestinal microbiota. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-16, 2015. Frontiers Media SA.

DUARTE, Rubens T. D. *et al.* Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology. **International Journal Of Astrobiology**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.325-333, 11 jul. 2012. Cambridge University Press (CUP).

DURAND, Guillaume André; RAOULT, Didier; DUBOURG, Grégory. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, n. 4, p. 371-382, 2019.

ELBENDARY, Afaf Ahmed *et al.* Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 1, p. 44-46, 2018.

FELIATRA, Feli *et al.* The potentials of secondary metabolites from *Bacillus cereus* SN7 and *Vagococcus fluvialis* CT21 against fish pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 105062, 2021.

FERREIRA, Clederson. **Dinâmica do microbioma da rizosfera de mandacaru na Caatinga**. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

FERREIRA, Luana. **Isolamento de micro-organismos endofíticos do Ipê Roxo (Tabebuia avellanadae) e avaliação da atividade antimicrobiana**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

GARCIA-GUTIERREZ, Enriqueta *et al.* Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. **Gut microbes**, v. 10, n. 1, p. 1-21, 2019.

GAWRYJÓŁEK, Karolina. Antibiotics in agriculture—application, threats and legal regulations. **Polish Journal of Agronomy**, v.47, p.10-21, 2021.

GENILLOUD, Olga. Natural products discovery and potential for new antibiotics. **Current opinion in microbiology**, v. 51, p. 81-87, 2019.

GHOSH, Chandradhish *et al.* Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 4, p. 323-338, 2019.

GOMAA, Eman Zakaria. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. **The journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 103-111, 2012.

GONG, An-Dong *et al.* Antifungal activity of volatile emitted from *Enterobacter asburiae* Vt-7 against *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage. **Food Control**, v. 106, p. 106718, 2019.

GOPI, Mohan *et al.* Antibacterial potential of sponge endosymbiont marine *Enterobacter* sp at Kavaratti Island, Lakshadweep archipelago. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 5, n. 2, p. 142-146, 2012.

GRAÇA, Ana Patrícia *et al.* The antimicrobial activity of heterotrophic bacteria isolated from the marine sponge *Erylus deficiens* (Astrophorida, Geodiidae). **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-14, 7 maio 2015.

GRANATO, Elisa T.; MEILLER-LEGRAND, Thomas A.; FOSTER, Kevin R. The evolution and ecology of bacterial warfare. **Current biology**, v. 29, n. 11, p. R521-R537, 2019.

GUPTA, Kartikey Kumar; RANA, Deepanshu. Preliminary study on inhibitory activity of *Enterobacter* sp. Strain KD111 isolated from the Cow feces. **Environment Conservation Journal**, v. 19, n. 3, p. 139-144, 2018.

HAMEED, Rafid Hadi; ABBAS, Fatima Moeen; HAMEED, Imad Hadi. Bioactive Chemical Analysis of *Enterobacter aerogenes* and Test of its Anti-fungal and Anti-bacterial Activity and Determination. **EXECUTIVE EDITOR**, v. 9, n. 5, p. 438, 2018.

HASHEM, Amr H. *et al.* Bacillus megaterium-mediated synthesis of selenium nanoparticles and their antifungal activity against Rhizoctonia solani in Faba Bean Plants. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 195, 2021.

HENTSCHEL, Ute *et al.* Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges Aplysina aerophoba and Aplysina cavernicola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, n. 3, p. 305-312, 2001.

HUG, Joachim J. *et al.* Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, p. 44, 2018.

ICHIKAWA, T. *et al.* Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia microbiologica**, v. 16, n. 3, p. 218-224, 1971.

ISMAIL-BEN ALI, A. *et al.* Jania rubens-associated bacteria: molecular identification and antimicrobial activity. **Journal of applied psychology**, v. 24, n. 3, p. 525-534, 2012.

JIANG, Yunjiang *et al.* Recent advances in design of antimicrobial peptides and polypeptides toward clinical translation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 261-280, 2021.

JUNG, Byung Kwon *et al.* Isolation of Burkholderia cepacia JBK9 with plant growth-promoting activity while producing pyrrolnitrin antagonistic to plant fungal diseases. **Applied Biological Chemistry**, v. 61, n. 2, p. 173-180, 2018.

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

KARBALAEI-HEIDARI, Hamid Reza; PARTOVIFAR, Mozhddeh; MEMARPOOR-YAZDI, Mina. Evaluation of the bioactive potential of secondary metabolites produced by a new marine micrococcus species isolated from the Persian Gulf. **Avicenna journal of medical biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 61, 2020.

KHALIFA, Ashraf YZ *et al.* Characterization of the plant growth promoting bacterium, Enterobacter cloacae MSR1, isolated from roots of non-nodulating Medicago sativa. **Saudi journal of biological sciences**, v. 23, n. 1, p. 79-86, 2016.

KHABTHANI, Sami; ROLAIN, Jean-Marc; MERHEJ, Vicky. In silico/in vitro strategies leading to the discovery of new nonribosomal peptide and polyketide antibiotics active against human pathogens. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, p. 2297, 2021.

KIM, Jaegoo *et al.* Antifungal activity of magnoflorine against Candida strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 1-7, 2018.

KIZHAKKEKALAM, Vinaya Kizhakkepatt; CHAKRABORTY, Kajal. Marine macroalgae-associated heterotrophic Firmicutes and Gamma-proteobacteria: prospective anti-infective agents against multidrug resistant pathogens. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 4, p. 905-920, 2020.

KHOCHAMIT, Nalisa *et al.* Bacillus subtilis and lactic acid bacteria improve the growth performance and blood parameters and reduce Salmonella infection in broilers. **Veterinary World**, v. 13, n. 12, p. 2663, 2020.

KHUSHALANI, Deepak *et al.* Novel Anti-Microbial Peptide from an Environmental Rare Actinobacterium. In: **Proceedings of International Conference on Drug Discovery (ICDD)**. 2020.

KUMAR, Madan *et al.* Genomic and proteomic analysis of lignin degrading and polyhydroxyalkanoate accumulating β -proteobacterium Pandoraea sp. ISTKB. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-23, 2018.

KUNAKOM, Sylvia; EUSTÁQUIO, Alessandra S. Natural products and synthetic biology: where we are and where we need to go. **Msystems**, v. 4, n. 3, p. e00113-19, 2019.

LEE, Learn-han *et al.* Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for antimicrobial metabolite production. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.2125-2137, 15 fev. 2012.

LEE, Learn-Han; GOH, Bey-Hing; CHAN, Kok-Gan. Actinobacteria: Prolific producers of bioactive metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1612, 2020.

LEE, Na-Kyoung; KIM, Won-Suck; PAIK, Hyun-Dong. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. **Food science and biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1297-1305, 2019.

LERTCANAWANICHAKUL, Monthon; SAWANGNOP, Songtham. Comparison of Two Methods Used for Measuring the Antagonistic Activity of Bacillus Species. **Walailak Journal Of Science And Technology**, Thailand, v. 5, n. 2, p. 161-171, nov. 2011.

LEWIS, Kim. New approaches to antimicrobial discovery. **Biochemical pharmacology**, v. 134, p. 87-98, 2017.

LUTI, Khalid Jaber Kadhum. Bacteriocin production by Staphylococcus epidermidis the normal flora of outer ear: a potential probiotic against outer ear infections. **Journal of Biotech Research**, v. 11, p. 13-22, 2020.

MACEDO-RAYGOZA, Gloria M. *et al.* Enterobacter cloacae, an endophyte that establishes a nutrient-transfer symbiosis with banana plants and protects against the black Sigatoka pathogen. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 804, 2019.

MAHLAPUU, Margit; BJÖRN, Camilla; EKBLÖM, Jonas. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: Opportunities and challenges. **Critical reviews in biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 978-992, 2020.

MAKUWA, Sephokoane Cindy; SEREPA-DLAMINI, Mahloro Hope. The antibacterial activity of crude extracts of secondary metabolites from bacterial endophytes associated with *Dicoma anomala*. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, 2021.

MARTÍNEZ-CARDEÑAS, Janeth Adriana *et al.* Effects of physical culture parameters on bacteriocin production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* after cellular induction. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 183-189, 2012

MATSUURA, T. *et al.* **Caracterização taxonomica de actinomicetos endofíticos produtores de antibioticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.): Takeshi Matsuura**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

MATOBOLÉ, Relebohile Matthew *et al.* Antibacterial activities of bacteria isolated from the marine sponges *Isodictya compressa* and *Higginsia bidentifera* collected from Algoa Bay, South Africa. **Marine Drugs**, v. 15, n. 2, p. 47, 2017.

MENDES-SILVA, Tayane de Cássia Dias *et al.* Production of carotenoid sarcinaxanthin by *Kocuria palustris* isolated from Northeastern Brazil Caatinga soil and their antioxidant and photoprotective activities. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 44-53, 2021

MOHANRAJ, D. *et al.* Bioprospecting of actinobacteria from Yelagiri hills with special reference to antibacterial activity. **J chem pharm res**, v. 3, n. 3, p. 439-446, 2011.

MORYA, Raj *et al.* Genomic analysis of *Burkholderia* sp. ISTR5 for biofunneling of lignin-derived compounds. **Biotechnology for biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2019.

MULLIS, Megan M. *et al.* Diversity, ecology, and prevalence of antimicrobials in nature. **Frontiers in Microbiology**, p. 2518, 2019.

NEVES, A.G.D. **Identificação molecular de bactérias edáficas em uma área de preservação no semiárido paraibano**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2016.

NGUYEN, Ngoc Anh *et al.* Enzymatic Production of 3-OH Phlorizin, a Possible Bioactive Polyphenol from Apples, by *Bacillus megaterium* CYP102A1 via Regioselective Hydroxylation. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1327, 2021.

NICOLAU, P. B. Microrganismos e ambiente: ar e água, solo e extremos. **Microrganismos e Ambiente**. **ABERTA**. 2016.

NISHA, P. *et al.* Characterization of bioactive compound produced by microfouling actinobacteria (*Micrococcus luteus*) isolated from the ship hull in Arabian Sea, Cochin. Kerala. **Materials Today: Proceedings**, v. 25, p. 257-264, 2020.

NONGKHLAW, Fenella Mw; JOSHI, Santa R. Investigation on the bioactivity of culturable endophytic and epiphytic bacteria associated with ethnomedicinal plants. **The Journal Of Infection In Developing Countries**, [s.l.], v. 9, n. 09, p.954-961, 27 set. 2015.

PALOMO, Sara *et al.* Sponge-derived Kocuria and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. **Marine drugs**, v. 11, n. 4, p. 1071-1086, 2013.

PETERSEN, Jørgen *et al.* Identification and characterization of a bioactive lantibiotic produced by *Staphylococcus warneri*. **Biological Chemistry**, v. 390, n. 5-6, p. 437-444, 2009.

PHONGHANPOT, Suranat; JARINTANAN, Faongchat. Secondary Metabolism Gene Diversity and Cocultivation toward Isolation and Identification of Potent Bioactive Compounds Producing Bacterial Strains from Thailand's Natural Resources. **Scientifica**, v. 2022, 2022.

QUINN, Gerry A. *et al.* *Streptomyces* from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 1040, 2020.

RADDADI, N. *et al.* Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 7907-7913, 2015.

RAMIREZ, Luz Stella; CASTAÑO, Darwin Marin. METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL. **Scientia Et Technica**, Pereira, Colombia, v. 15, n. 42, p. 263-268, ago. 2009.

RANJAN, Ravi; JADEJA, Vasantba. Isolation, characterization and chromatography based purification of antibacterial compound isolated from rare endophytic actinomycetes *Micrococcus yunnanensis*. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 7, n. 5, p. 343-347, 2017.

RIOS, Jose-Luis; RECIO, Maria Carmen; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

RYAN, Robert P. *et al.* The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 7, n. 7, p.514-525, jul. 2009. Springer Science and Business Media LLC.

RICHTER, D. C. *et al.* Infections due to multidrug-resistant pathogens: pathogens, resistance mechanisms and established treatment options. **Der Anaesthetist**, v. 68, n. 10, p. 711-730, 2019.

ROJAS-SOLIS, D.; ZETTER-SALMON, E.; CONTRERAS-PEREZ, M. Carmen Rocha-Granados M. del, Maclas-Rodriguez L., Santoyo G. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 13, p. 46, 2018.

ROMANENKO, L. A. *et al.* The Biodiversity and Antimicrobial Activity of Bacteria Isolated from the Bottom Sediments of the Chukchi Sea. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 46, n. 5, p. 351-359, 2020.

RUA, Cintia PJ *et al.* Diversity and antimicrobial potential of culturable heterotrophic bacteria associated with the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **PeerJ**, v. 2, p. e419, 2014.

SÁNCHEZ-OTERO, Maria-Guadalupe *et al.* Unique microorganisms inhabit extreme soils. In: **Microbes and Enzymes in Soil Health and Bioremediation**. Springer, Singapore, p. 39-73, 2019.

SANTOS, Olinda CS *et al.* Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 604-612, 2010.

SCHMITZ, Daniela; ZAPP, Josef; BERNHARDT, Rita. Hydroxylation of the triterpenoid dipterocarpol with CYP106A2 from *Bacillus megaterium*. **The FEBS journal**, v. 279, n. 9, p. 1663-1674, 2012.

SEERANGARAJA, Vijayaram *et al.* Isolation and characterization of bioactive compounds for *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* from *Oreochromis mossambicus* and *Labeo rohita*. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res**, v. 43, n. 2, p. 71-77, 2017.

SEO, Weon Taek *et al.* Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 493-503, 2010.

SETIAWAN, Andi *et al.* Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. **Journal of fungi**, v. 8, n. 3, p. 280, 2022.

SHASTRY, Rajesh P.; REKHA, P. D.; RAI, V. Ravishankar. Biofilm inhibitory activity of metallo-protein AHL-lactonase from cell-free lysate of endophytic *Enterobacter* species isolated from *Coscinium fenestratum* Gaertn. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101009, 2019

SINGH, Namita *et al.* Purification, characterization and antibacterial spectrum of a compound produced by *Bacillus cereus* MTCC 10072. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 9, p. 1195-1205, 2019.

SINGH, Kumar Siddharth *et al.* Antimicrobial resistance dynamics and the one-health strategy: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 4, p. 2995-3007, 2021.

SLATTERY, M.; RAJBHANDARI, I.; WESSON, K. Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 2, p. 90-96, 2001.

SRIRAM, Muthu Irulappan *et al.* Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 174-181, 2011.

SRIVASTAV, A.; POFALI, P. Screening of antimicrobial activity and Polyketide synthase gene identification from the Actinomycetes isolates. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 10, n. 4, 2018.

STOICA, ROXANA-MĂDĂLINA *et al.* Antimicrobial compounds of the genus *Bacillus*: A review. **Rom Biotechnol Lett**, v. 24, n. 6, p. 1111-1119, 2019.

TRACANNA *et al.* Mining prokaryotes for antimicrobial compounds: from diversity to function. **Fems microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 417–429, 2017.

VALGAS, Cleidson *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.369-380, jun. 2007.

VELHO-PEREIRA, Sonashia; KAMAT, N. M. Antimicrobial screening of actinobacteria using a modified cross-streak method. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 73, n. 2, p. 223, 2011.

WESTHOFF, Sanne *et al.* Competition sensing changes antibiotic production in *Streptomyces*. **Mbio**, v. 12, n. 1, p. e02729-20, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis**. World Health Organization, 2017.

XIE, Yudan *et al.* Isolation and identification of antibacterial bioactive compounds from *Bacillus megaterium* L2. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 645484, 2021.

YU, Jing *et al.* Comparative transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms related to oxytetracycline-resistance in strains of *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, v. 21, p. 100812, 2021.

ZEIDAN, Randa *et al.* In-Vitro Application of a Qatari Burkholderia cepacia strain (QBC03) in the Biocontrol of Mycotoxigenic Fungi and in the Reduction of Ochratoxin A biosynthesis by Aspergillus carbonarius. **Toxins**, v. 11, n. 12, p. 700, 2019.