

BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS NO CERRADO BRASILEIRO

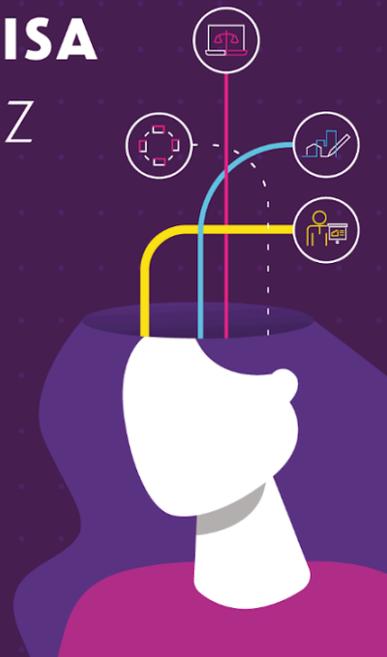
Professora orientadora: Kelly Cristina Rodrigues Simi

Aluna: Layza Alves Miranda Leite

PROGRAMA DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA
PIC/CEUB

RELATÓRIOS DE PESQUISA
VOLUME 9 Nº 1- JAN/DEZ
•2023•

ISSN: 2595-4563



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

LAYZA ALVES MIRANDA LEITE

BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS NO CERRADO BRASILEIRO

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Kelly Cristina Rodrigues Simi

BRASÍLIA

2024

Dedico este trabalho à minha mãe, por seu apoio e força nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente à minha mãe por seu incentivo na construção da minha carreira, por sempre acreditar em mim e pelos momentos em que se desesperou mais do que eu quando enfrentei dificuldades.

Sou intensamente grato à professora orientadora Kelly Simi pelo suporte e orientação ao longo desta jornada, sem a sua ajuda, este projeto não teria sido possível.

Sou grata aos meus amigos pelo apoio constante e pela paciência em me ouvir durante todo esse período.

Por fim, agradeço a Assessoria de Pesquisa e Extensão e a equipe do LABOCIEN por seu auxílio e orientação.

RESUMO

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas com organização filamentosa encontradas na rizosfera. Destacam-se pela produção de importantes metabólitos secundários com grande interesse biotecnológico, como a produção de pigmentos e a atividade antimicrobiana, muito utilizada na indústria farmacêutica. O solo do Cerrado apresenta características ambientais especiais, no entanto, são realizadas poucas pesquisas específicas e qualificadas sobre as actinobactérias. Contudo, este solo tem como potencial para a presença de diversos microrganismos produtores de moléculas com grande interesse biotecnológico e ecológico, devido à sua baixa fertilidade. Ao criar um banco dessas bactérias, torna-se possível analisar diferentes potenciais e caracterizá-las para serem utilizadas pela indústria. Com isso, o objetivo deste trabalho é efetuar a bioprospecção de actinobactérias devido à sua alta diversidade cromogênica e, assim, disponibilizar um banco para a execução de análises posteriores. A coleta de amostras foi realizada em 5 parques diferentes na região do Distrito Federal, visando à diferenciação do local e das características do solo. Para o isolamento das bactérias, as amostras de solo foram submetidas a uma diluição 10^{-1} e inoculadas em meio ISP-3 por 7 dias, selecionando e identificando as colônias separadamente após o período de incubação a 37°C . Foi realizada a análise morfológica das colônias quanto à coloração do micélio aéreo e vegetativo, pigmento melanóide e caracterização micromorfológica com a técnica de cultivo em lâmina. A avaliação da atividade antimicrobiana, utilizando o método de difusão em meio Ágar Mueller Hinton, revelou que apenas 7 linhagens (11,47%) de 61 colônias de actinobactérias testadas apresentaram possível potencial antimicrobiano com halo de inibição de 1 mm a 10 mm. Foram colecionadas 65 cepas de actinobactérias, contendo 52 tipos cromogênicos, e feita a caracterização micromorfológica de 18 colônias, das quais 14 (77,77%) colônias podem pertencer ao gênero *Streptomyces*. O banco está disponível para acesso, com ressalvas, aos alunos do Centro Universitário de Brasília no campus da Asa Norte.

Palavras-chave: actinobactérias; rizosfera; cerrado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Amostras de solo de diferentes locais, pontos e profundidades..... 24

Figura 2 Isolamento em tubo falcon com meio ISP-3 sólido de actinobactérias..... 40

Figura 3 Microcultivo da cepa 5-C2 no meio ISP-3 contendo lamínulas..... 41

Figura 4 Presença de pigmento melanóide na colônia 24-C5..... 46

Figura 5 Exemplo de inibição. Linhagem: 22-C1 (3mm) contra *Enterococcus faecalis*..47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Locais de coleta de solo e localização geográfica dos pontos coletados.....	19
Tabela 2	Caracterização das amostras de solo coletadas no Distrito Federal (Dados atmosféricos retirados do aplicativo Tempo).....	25
Tabela 3	Tipos culturais das cepas de actinobactérias isoladas a partir da pigmentação do micélio aéreo e vegetativo.....	33
Tabela 4	Registro fotográfico das estruturas micromorfológicas de actinobactérias do Cerrado brasileiro.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Representação da umidade relativa do ar e a quantidade de actinobactérias isoladas de cada local..... 31

Gráfico 2 Porcentagem da coloração do micélio aéreo das cepas de actinobactérias do Cerrado brasileiro..... 38

Gráfico 3 Porcentagem da coloração do micélio vegetativo das cepas de actinobactérias do Cerrado brasileiro.....39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Placas de isolamento com actinobactérias de diferentes locais.....	32
Quadro 2	Imagens selecionadas de 30 cepas de actinobactérias encontradas no Cerrado brasiliense. Diversidade de pigmentação do micélio aéreo.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 - JUSTIFICATIVA.....	13
1.2 - OBJETIVOS.....	13
1.2.1 - OBJETIVO GERAL.....	13
1.2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. CERRADO BRASILEIRO.....	15
2.2. DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS NA RIZOSFERA.....	15
2.3. ACTINOBACTÉRIAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	17
3. MÉTODO.....	19
3.1. TIPO DE PESQUISA.....	19
3.2. ÁREA DE ESTUDO.....	19
3.2.1- Localização da área de estudo e coleta das amostras.....	19
3.2.2- Período da coleta das amostras e fatores climáticos.....	20
3.3. COLETA DE AMOSTRAS.....	20
3.4. ISOLAMENTO DE ACTINOBACTÉRIAS.....	20
3.4.1- Reisolamento de colônias bacterianas em placa.....	21
3.4.2- Reisolamento líquido e sólido em tubo.....	21
3.5. COLORAÇÃO DO MICÉLIO AÉREO E VEGETATIVO.....	21
3.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	22
3.7. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	22
3.8. BANCO DE ACTINOBACTÉRIAS.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. COLETA DE SOLO.....	24
4.1.1. Amostras de solo.....	24
4.1.2. Isolamento de actinobactérias.....	32
4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS ACTINOBACTÉRIAS.....	34
4.2.1. Caracterização Micromorfológica.....	34
4.2.2. Caracterização Micromorfológica.....	42
4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	49
4.4. BANCO DE ACTINOBACTÉRIAS.....	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
6. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado compreende mais de 22% do território brasileiro, abrangendo os estados de São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Maranhão, Tocantins, Piauí, Paraná, Rondônia, Goiás, Mato Grosso e o Distrito Federal, além de áreas disjuntas localizadas no Amapá, Roraima, Pará e na Amazônia (Sanaiotti, 1991; Miranda e Absy, 2000). O Cerrado é considerado o segundo maior bioma do Brasil, atrás somente da Floresta Amazônica. O que diferencia o Cerrado do restante dos demais biomas brasileiros é a característica de seu solo, que possui alta capacidade de drenagem de águas pluviais, baixa fertilidade e alto teor de alumínio (Sousa; Lobato, 2004), além de sua elevada biodiversidade e teor de endemismo. O bioma é considerado um hotspot ameaçado, onde ocorre a degradação de seus habitats (Martins, Coneglian, 2019 *apud* Mittermeier et al., 2011; Martinelli et al., 2014) e seu solo é favorável para o crescimento, diversidade e atividade de microrganismos (Cattelan; Vidor, 1990). O cerrado possui um clima sazonal, caracterizado por altas temperaturas e períodos chuvosos e secos. O período seco ocorre de abril a setembro, enquanto o período úmido vai de outubro a março (Silva, M. 2012 *apud* Klink; Machado, 2005).

O solo é um habitat natural e complexo, constituído por uma grande diversidade microbiológica e por processos biológicos, químicos e físicos. Além de impactar diretamente na manutenção da microfauna, é também influenciado por fatores ambientais e pela alta atividade microbiológica. Um dos principais sistemas biológicos de regulação (SBR) é a rizosfera, que apresenta um habitat rico em nutrientes e uma intensa atividade microbiana devido à produção de exsudatos liberados pelas raízes das plantas, ocorrendo uma relação de simbiose entre plantas, fungos, bactérias e actinobactérias (Correia, Oliveira, 2000; Silva, G. 2013 *apud* Ding et al., 2004; Michereff et al., 2005; Rasche et al., 2006; Melo e Azevedo, 2008; Berg e Smalla, 2009; Embrapa, 2012).

A rizosfera compreende a região do solo mais próxima à raiz da planta e possui uma alta diversidade de microrganismos devido à liberação de diversos compostos

orgânicos pelas raízes das plantas, favorecendo a proliferação de bactérias, actinomicetos e fungos no solo (Uesugi et al., 2021 *apud* Cardoso, 2016; Corrêa, 2014; Silva, 2010). A biomassa é composta por esses organismos, que exercem um papel na decomposição de materiais orgânicos, na formação do solo, na biorremediação e em outras atribuições. Dessa forma, é possível utilizar a biomassa microbiana como um bioindicador de alterações no nível de material orgânico, essencial para a fertilidade do solo (Júnior, Mendes, 2007 *apud* Tótola, Chaer, 2002).

Dentre os organismos presentes na biomassa, os actinomicetos se destacam por possuírem metabólitos secundários de grande interesse biotecnológico, exercendo um papel na produção de mais de 50% dos antibióticos atuais. Entre as actinobactérias estudadas, o gênero *Streptomyces* é considerado de grande importância biotecnológica para a produção da maior parte dos antibióticos, sendo uma fonte natural capaz de inibir o crescimento de bactérias multirresistentes e de produzir diversos metabólitos ativos, que incluem enzimas de aplicação industrial (Uesugi et al., 2021 *apud* Ferreira, 2016; Kumar e Jadeja, 2016; Yushchul, 2020; Zhao, 2019). Este filo é encontrado com grande predominância no solo, mas também pode ser detectado em habitats diversos, como desertos e águas marinhas (Silva, G. 2013).

As actinobactérias são caracterizadas como um filo diversificado e abundante, composto por 6 classes, 25 ordens, 52 famílias e 232 gêneros, sendo assim o maior grupo de bactérias atualmente (Hoyos, 2018 *apud* Sathya, 2017). Esse filo corresponde a um grupo de bactérias gram-positivas, com organização filamentosa, produtoras de esporos e é caracterizado por uma alta quantidade de guanina e citosina em seu DNA (Hoyos, 2018 *apud* Doumbou et al., 2002; Stach et al., 2003). Desempenham papéis fundamentais na degradação de macromoléculas com estruturas complexas encontradas no solo, como celulose, amido e a substância geosmina, responsável pelo odor semelhante ao de terra molhada, característico do filo. São de grande valor econômico e biotecnológico, ao se envolverem em processos de síntese de enzimas e vitaminas, produção de biocombustíveis e antibióticos (Silva, M. 2012 *apud* Moreira, Siqueira, 2006; Miao, Davies, 2010; Vining, 1990). Destacam-se também pela produção de pigmentos de colorações diversas com tons de amarelo, rosa, vermelho, preto, branco, azul, marrom e roxo, que podem ser retidos no micélio aéreo e/ou vegetativos,

além de poderem apresentar pigmento melanóide (Ramos et al., 2015 *apud* Prauser, 1964).

1.1 - JUSTIFICATIVA

Baseado neste contexto, é importante investigar as actinobactérias presentes no Cerrado brasiliense devido ao fato de seu solo apresentar características ambientais especiais e à falta de pesquisas específicas e qualificadas sobre essas bactérias presentes neste bioma (Silva, G. 2013). Essas bactérias representam uma excelente fonte de exploração para diversos ramos da indústria, como a produção de enzimas e substâncias bioativas para a indústria farmacêutica e tecnológica (Silva, M. 2012 *apud* Azeredo et al., 2004). Portanto, o estudo das bactérias presentes na rizosfera de plantas do Cerrado é de extrema importância devido ao solo com baixa fertilidade, que pode ser um berço para microrganismos produtores de metabólitos com grande importância biotecnológica. O presente projeto de bioprospecção de actinobactérias justifica o grande interesse econômico ao realizar um levantamento de diferentes gêneros presentes no Cerrado brasiliense e seu potencial de atividade antimicrobiana, além de proporcionar um banco de actinobactérias com a finalidade de facilitar futuras pesquisas. Manter um banco dessas bactérias permite que os pesquisadores acessem, analisem e visualizem as amostras sem a necessidade de retornar ao local de coleta. Esse banco é extremamente importante para manter as informações, a integridade e a organização dos registros dessas actinobactérias, para que possam ser utilizadas (Heuser, 2004).

1.2 - OBJETIVOS

1.2.1 - OBJETIVO GERAL

Realizar a bioprospecção de actinobactérias da rizosfera do bioma Cerrado (particularmente em Brasília) e avaliar o potencial antimicrobiano e características micromorfológicas dos isolados.

1.2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar actinobactérias do solo rizosférico em meio ISP-3
- Avaliar potencial antimicrobiano de cada isolado
- Avaliar pigmentação em tecido de cada isolado
- Identificar as actinobactérias em nível de gênero
- Comparar os isolados de tempo chuvoso e seco
- Confeção de uma banco de actinobactérias para a instituição

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CERRADO BRASILEIRO

De acordo com IBGE (2004), o bioma Cerrado consiste em uma savana Neotropical localizada na América do Sul, abrangendo mais de 10 estados e o Distrito Federal. É o segundo maior bioma do Brasil, ocupando aproximadamente 24% do território nacional. A alta biodiversidade e teor de endemismo do Cerrado são impactados diretamente pela degradação de seu habitat, que é considerado um hotspot ameaçado (Martins, Coneglian, 2019 *apud* Mittermeier et al., 2011; Martinelli et al., 2014). Dados divulgados pelo IBGE (2004) mostram que o Cerrado é um dos principais polos de expansão da produção agrícola do Brasil, o que impacta consideravelmente a cobertura vegetativa nativa e resulta na fragmentação de seus habitats, levando a perdas significativas da biodiversidade.

Este bioma é reconhecido por sua rica biodiversidade. A flora do Cerrado apresenta mais de 10.000 espécies de plantas, já a sua fauna também é diversificada com 837 espécies de aves, 67 gêneros de mamíferos (161 espécies, sendo 19 delas endêmicas), 150 espécies de anfíbios e 120 espécies de répteis.

O clima é sazonal, com períodos secos e úmidos, e é caracterizado por altas temperaturas e solo com alta capacidade de drenagem de água pluvial (Silva, G. 2013 *apud* Klink; Machado, 2015; Sousa; Lobato, 2004). A temperatura pode variar, mesmo com precipitações pluviais semelhantes em todo o bioma (NIMER, 1989). Segundo a classificação tradicional de Köppen, o clima do Cerrado é Tropical Chuvoso (Ribeiro; Walter, 1988), mas ao sul, pode ocorrer o clima Tropical de Altitude, por conta de suas regiões elevadas (Eiten, 1994).

2.2. DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS NA RIZOSFERA

O solo é considerado um berço de grande diversidade de microrganismos, como fungos e bactérias. Suas características são determinadas pela quantidade e variedade de organismos presentes, que são capazes de influenciar diretamente as propriedades

químicas, físicas e biológicas do solo (Correia; Oliveira, 2000 *apud* Pankhurst; Lynch, 1994).

O conceito de “rizosfera” foi definido inicialmente por Hiltner em 1904 e refere-se à região do solo adjacente às raízes das plantas, influenciado por estas. A rizosfera é caracterizada por alta atividade e diversidade microbiana (Melo; Azevedo, 2008). Isso ocorre devido à liberação de compostos orgânicos pelas raízes, como açúcares, vitaminas e aminoácidos, que favorecem a proliferação de bactérias e fungos no solo (Uesugi et al., 2021 *apud* Cardoso, 2016; Corrêa, 2014; Silva, 2010).

A rizosfera é rica em microrganismos que produzem 80% do nitrogênio e 75% do fósforo absorvido pelas árvores em florestas de clima temperado e boreal (Baldrian, 2017). Nesta região do solo ocorre a maior concentração de nutrientes, o que facilita o desenvolvimento da microbiota presente. Esses organismos exercem processos importantes, como a produção de antibióticos, patogênese e fitossanidade (Silva, G. 2013 *apud* Kent; Triplett, 2002), além de poderem ter relações positivas, neutras ou deletérias no desenvolvimento da planta (Lambert et al., 1987).

A comunidade microbiológica presente na rizosfera é impactada diretamente pela composição de compostos no solo liberados pela raiz. Dessa forma, a diversidade de microrganismos depende dos nutrientes presentes na rizosfera, ou seja, as alterações das plantas têm efeito direto sobre essa comunidade. As bactérias também podem influenciar no crescimento das plantas por meio da produção de substâncias químicas, por exemplo (Melo; Azevedo, 2008 *apud* Bertrand et al., 2001).

Diferentes microrganismos, como actinobactérias, fungos e bactérias, possuem algumas características específicas do solo. As actinobactérias predominam em solos orgânicos com pH neutro a levemente alcalino e podem ser encontradas em solos bem drenados. Estudos sugerem que esses microrganismos carecem de menor potencial hídrico para o seu desenvolvimento. Os fungos são encontrados em ambiente ácidos, enquanto algumas bactérias preferem solos com pH acima de 6,0 (Melz; Tiago, 2009 *apud* Madigan, 2004; Silva, G. 2013 *apud* Madigan et al., 2010).

2.3. ACTINOBACTÉRIAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

O filo Actinobacteria é caracterizado principalmente por bactérias com organização filamentosa, frequentemente ramificada, formada por um micélio aéreo e vegetativo. Inicialmente, as actinobactérias foram consideradas como fungos devido à produção de cadeias de esporos e à presença de hifas, semelhante aos conídios (Lechevalier; Lechevalier, 1967). É caracterizado como um filo diversificado e abundante, compreendendo 6 classes, 25 ordens, 52 famílias e 232 gêneros.

São bactérias gram-positivas, destacando-se pela alta quantidade de guanina e citosina em seu genoma (Dombou et al, 2002 *apud* Fox and Stackebrandt 1987; Goodfellow and Cross 1984; Goodfellow et al. 1992; Stackebrandt and Woese 1981). Elas podem apresentar diferentes micromorfologias como fragmentação em hifas em *Nocardia* spp., morfologia cocóide em *Micrococcus*, ou micélio ramificado e diferentes cadeias de esporos em *Streptomyces* (Letek et al.,2012).

As actinobactérias estão distribuídas em variados ecossistemas, especialmente no solo, como microrganismos cosmopolitas. Desempenham, em sua maioria, papéis biológicos essenciais na reciclagem de biomateriais, ao viverem como organismos saprofíticos e realizando a degradação de macromoléculas com estruturas complexas encontradas no solo. São reconhecidas pelo odor característico de terra molhada ao digerir substâncias e produzir compostos, e podem relações mutualísticas ou parasitárias com animais e plantas. Sendo reconhecidos pela indústria ao se envolverem em diversos processos físicos, químicos e biológicos, como a síntese de antibióticos e enzimas (Goodfellow; Williams, 1983; Silva, M. 2012 *apud* Moreira, Siqueira, 2006; Miao, Davies, 2010; Vining, 1990).

Esses microrganismos são produtores de pigmentos com diversas colorações, critério que auxilia a caracterização cultural e identificação de actinobactérias (Brito et al., 2018 *apud* Amsaveni et al., 2015). Esses pigmentos possuem colorações variadas que podem estar retidos no micélio aéreo e/ou vegetativo com tons de amarelo, rosa, vermelho, preto, branco, azul, marrom e roxo (Ramos et al., 2015 *apud* Prauser, 1964).

Um dos potenciais das actinobactérias é sua utilização na agricultura como biocontrole ao produzir enzimas glucanólíticas e quitinolíticas, estudo comprovado por

Hoyos (2018). O gênero *Streptomyces* também possui potencial na produção de novos antibióticos contra bactérias multirresistentes demonstrado no trabalho de Silva G. (2013).

A urgência de uma coleção autêntica como referência para a caracterização de actinobactérias, foi ressaltada por inúmeras conferências e reuniões. Surgindo assim o projeto de Shirling e Gottlieb (1966), no qual juntou métodos para caracterizar espécies dessas bactérias. Este projeto foi essencial para identificar características e selecionar métodos para o isolamento e caracterização morfológicas das colônias.

Outro projeto foi realizado pela Society for Actinomycetes Japan para garantir definições de actinomicetos sem incertezas, realizando uma coleção de informações e imagens. Possibilitando a navegação usando a seção, taxonomia, gênero e metabolismo de actinobactérias.

No gênero *Streptomyces* é utilizado a morfologia para a identificação e diferenciação entre outras actinobactérias. Sua caracterização micromorfológica pode ser realizada através da microscopia do micélio aéreo, no qual é formada uma cadeia de esporos de diferentes formatos: retos, flexíveis, espirais ou longos espirais. A caracterização micromorfológica também exerce um papel fundamental para a identificação de actinobactérias, como a textura do micélio aéreo e a pigmentação de esporos. Contendo critérios que facilitam na classificação, identificação e possíveis variáveis de valor taxonômico (Williams et al., 1989).

3. MÉTODO

3.1. TIPO DE PESQUISA

A bioprospecção de actinobactérias envolve a realização de uma pesquisa experimental e a criação de um banco de microrganismos no Cerrado Brasiliense. Foram realizadas análises laboratoriais para coletar dados de atividade antimicrobiana e caracterização morfológica. Além disso, foi estabelecido um banco para facilitar futuras pesquisas.

3.2. ÁREA DE ESTUDO

3.2.1- Localização da área de estudo e coleta das amostras

As coletas foram realizadas em áreas de cerrado em 5 parques do Distrito Federal, com dois pontos selecionados em cada parque, seguindo os critérios: (1) região rizosférica de uma árvore e (2) ausência de grama na superfície do solo.

Tabela 1: Locais de coleta de solo e localização geográfica dos pontos coletados.

Locais de Coleta	Ponto de Coleta	Latitude	Longitude
Parque da Cidade Dona Sarah Kubitschek	A	-15.8029624	-47.9152967
	B	-15.8029014	-47.9134664
Parque Olhos D'Água	C	-15.7443480	-47.8831618
	D	-15.7423628	-47.8865772
Parque Ecológico de Águas Claras	E	-15.8350696	-48.0254593
	F	-15.8325130	-48.0205824
Parque Lago do Cortado	G	-15.8133722	-48.0779133
	H	-15.8132538	-48.0786512
Taguaparque	I	-15.8204161	-48.0546307
	J	-15.8163616	-48.0568798

Fonte: Do autor. Coordenadas retiradas com auxílio do Google Maps.

3.2.2- Período da coleta das amostras e fatores climáticos

As coletas tiveram início em 23/09/2023 no Parque da Cidade Dona

Sarah Kubitschek, e foram concluídas em 07/03/2024, no Parque Lago do Cortado. Durante este período, a umidade relativa do ar variou entre 24°C e 75°C (Tabela 2). No Distrito Federal, essa época corresponde à estação chuvosa, com exceção da primeira coleta, realizada durante o período da seca. Portanto, foi aguardado um intervalo de alguns dias após a última precipitação chuvosa antes de realizar coleta.

3.3. COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de solo foram coletadas nas profundidades de 0 cm, 5 cm e 10 cm na região rizosférica de cada ponto de coleta, com auxílio de uma fita métrica e pá. Ao todo foram coletadas 30 amostras de solo de diferentes locais, pontos e profundidades (Tabela 2), que foram armazenados em sacos plásticos identificados para o transporte até o Centro Universitário de Brasília.

As amostras que apresentaram alta umidade foram expostas ao sol para promover a evaporação de água e prevenir a proliferação de outras bactérias, prevalecendo assim, os esporos de actinomicetos (Williams & Cross, 1971).

3.4. ISOLAMENTO DE ACTINOBACTÉRIAS

A seguinte metodologia foi baseada no protocolo de Nunes (2020), onde cada amostra de solo foi diluída na proporção de 1 g de solo para 9 ml de solução fisiológica estéril em um tubo falcon de 10 ml, resultando em uma concentração de 10^{-1} . Após a mistura da amostra por 15 minutos em um homogeneizador, foi colocado no banho maria à 50°C por 30 min e retirado 100 µl da suspensão da amostra, transferindo para um novo tubo contendo 900µl de solução fisiológica estéril, resultando em uma nova diluição. Dessa diluição, 0,1 ml de alíquota foi retirado e plaqueado em placas de Petri com o meio de cultura sólido nº 3 do International *Streptomyces* Project (ISP-3) contendo aveia, traços de sais e ágar, descrito por Shirling e Gottlieb (1966). Foi incubado à 37°C por duas semanas.

3.4.1- Reisolamento de colônias bacterianas em placa

Após o crescimento das placas de isolamento, as colônias foram isoladas utilizando a técnica de semeadura por esgotamento, no mesmo meio e nas mesmas condições de cultivo usadas para o isolamento inicial.

3.4.2- Reisolamento líquido e sólido em tubo

Após o cultivo de colônias de actinobactérias em placas, foi realizada a semeadura em profundidade em tubos com meios sólidos e líquidos para a manutenção e testes posteriores. Os tubos contendo meio sólido ISP-3 com as colônias selecionadas, foram incubados à 37°C até o crescimento das colônias (7 a 15 dias) e, em seguida, mantidos em refrigeração para a preservação. Os tubos falcon de 15ml contendo 6 a 8ml de meio líquido ISP-3 com as colônias selecionadas, foram cultivados em um homogeneizador à temperatura ambiente por 7 a 14 dias.

3.5. COLORAÇÃO DO MICÉLIO AÉREO E VEGETATIVO

Com base no *Projeto Internacional de Streptomyces*, a análise da diversidade dos tipos culturais das colônias foi classificada de acordo com a presença e coloração do micélio aéreo e vegetativo (reverso). Foram avaliadas 63 cepas de actinobactérias das placas de reisolamento contendo o meio ISP-3, baseando-se na lista de cores de RAL CLASSIC.

3.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O potencial de atividade antimicrobiana foi testado contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, utilizando a técnica de poços por difusão em meio Ágar Mueller Hinton (perfuração em ágar), parte do método descrito por Kirby e Bauer (1966). As colônias de actinobactérias foram cultivadas em meio líquido por 10 dias em um homogeneizador à temperatura

ambiente. Após este período, 1 ml do meio líquido foi retirado e centrifugado por 15 minutos a 2.000 rpm. A suspensão obtida foi então introduzida nos poços feitos com ponteiros estéreis nas placas, já semeadas com as cepas bacterianas, e após 16 horas de incubação a 37°C, foram analisados os halos de inibição para avaliar a atividade antimicrobiana.

3.7. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Na análise micromorfológica utilizou-se a técnica de cultura em lâmina (microcultivo) descrita por Shirling e Gottlieb (1966), visando a avaliação de características morfológicas como o fenótipo, tipos de esporóforos e coloração Gram, permitindo a identificação em nível de gênero das actinobactérias. O cultivo das linhagens foi realizado em placas de Petri contendo meio sólido ISP-3, com uma estria central e duas lamínulas inseridas parcialmente com uma inclinação de 45° para a observação em microscópio. Após o período de incubação a 37° por 6 a 9 dias, as lamínulas foram retiradas e colocadas em lâminas para a observação em microscópio óptico, permitindo a análise de características micromorfológicas de cada actinobactéria e a possível presença de pigmentos melanóides.

3.8. BANCO DE ACTINOBACTÉRIAS

Para a criação do banco de actinobactérias, foi transferido 1ml de cada colônia, obtida a partir do cultivo líquido, para um tubo Eppendorf e centrifugado por 20 minutos. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 100 µl de óleo mineral ao sedimento celular.

As amostras das células, armazenadas em eppendorf, e das colônias isoladas em tubos falcon de 15ml, serão mantidas em refrigeração para testes futuros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COLETA DE SOLO

4.1.1. Amostras de solo

Na figura 1, pode-se observar a diversidade do aspecto e coloração do solo de diferentes locais, pontos e profundidades. Dos números 1 a 6, foi feita a coleta no ponto A (1 a 3) e B (4 a 6), observando a coloração de terra avermelhada. Os números de 7 ao 12, foram coletados no ponto C (7 a 9) e D (10 a 12), apresentando uma coloração avermelhada mais clara. Dos números 13 a 18, a coleta foi feita no ponto E (13 a 15) e F (16 ao 18) e apresentaram um tom de terra escura mais acinzentado e amarelada. Os números de 19 a 24 foram coletados no ponto G (19 a 21) e H (22 a 24), o ponto G contendo uma terra mais clara avermelhada, enquanto o ponto H uma terra escura. Por fim, os números do 25 ao 30 correspondem aos pontos I (25 a 27) e J (28 a 30) com tons escuros e avermelhados (Figura 1 e Tabela 2).

Figura 1: Amostras de solo de diferentes locais, pontos e profundidades.



Fonte: Do autor.

Tabela 2: Caracterização das amostras de solo coletadas no Distrito Federal.

Local: Parque da Cidade Dona Sarah Kubitschek			
Data de coleta: 23/09/2023			
Horário de coleta: 12h00 às 14h00			
Temperatura: 33°C			
Umidade relativa do ar: 24%			
Ponto	N° da Amostra	Profundidade	Característica morfológica do solo
A	1	Superfície (0 cm)	Horizonte: O Cor: Marrom escuro avermelhado Estrutura: Terra fina com quantidade relevante de pedras de terra pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.
	2	5 cm	Horizonte: O Cor: Marrom escuro avermelhado Estrutura: Terra fina com grande quantidade de pedras de terra pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.
	3	10 cm	Horizonte: O Cor: Marrom escuro avermelhado Estrutura: Terra fina com pequena quantidade de pedras de terra pequenas. Presença de galhos pequenos.
B	4	Superfície (0 cm)	Horizonte: O Cor: Marrom escuro avermelhado Estrutura: Terra fina com quantidade relevante de pedras de terra pequenas.

			Presença de galhos pequenos.
	5	5 cm	Horizonte: O Cor: Marrom escuro avermelhado Estrutura: Terra fina com grande quantidade de pedras de terra pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.
	6	10 cm	Horizonte: O Cor: Marrom escuro avermelhado Estrutura: Terra fina com grande quantidade de pedras de terra pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.
<p>Local: Parque Olhos D'Água Data de coleta: 17/11/2023 Horário de coleta: 09h00 às 11h00 Temperatura: 30°C Umidade relativa do ar: 44%</p>			
Ponto	Nº da Amostra	Profundidade	Característica morfológica do solo
C	7	Superfície (0 cm)	Horizonte: O Cor: Marrom Estrutura: Terra fina com pedras pequenas e médias. Presença de folhas e galhos pequenos.
	8	5 cm	Horizonte: O Cor: Marrom claro avermelhado. Estrutura: Terra fina com pouca quantidade de pedras pequenas.

			Presença de folhas e galhos pequenos.
	9	10 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom claro avermelhado</p> <p>Estrutura: Terra fina com pouca quantidade de pedras pequenas.</p>
D	10	Superfície (0 cm)	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom</p> <p>Estrutura: Terra fina com pedras pequenas e médias. Presença de folhas e galhos pequenos.</p>
	11	5 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom claro, um pouco mais escuro</p> <p>Estrutura: Terra fina com pedras pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.</p>
	12	10 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom claro</p> <p>Estrutura: Terra fina com pedras pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.</p>
<p>Local: Parque Ecológico de Águas Claras</p> <p>Data de coleta: 18/10/2023</p> <p>Horário de coleta: 08h00 às 09h00</p> <p>Temperatura: 29°C</p> <p>Umidade relativa do ar: 27%</p>			
Ponto	N° da Amostra	Profundidade	Característica morfológica do solo

E	13	Superfície (0 cm)	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom claro acinzentado</p> <p>Estrutura: Terra fina com pedras pequenas e médias. Presença de folhas e galhos pequenos.</p>
	14	5 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom claro acinzentado</p> <p>Estrutura: Terra fina com pedras pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.</p>
	15	10 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom claro acinzentado</p> <p>Estrutura: Terra fina com pedras pequenas.</p>
F	16	Superfície (0 cm)	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom claro amarelado</p> <p>Estrutura: Terra fina com pouca quantidade de pedras pequenas. Presença de galhos pequenos.</p>
	17	5 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro</p> <p>Estrutura: Terra fina com grande quantidade de pedras pequenas. Presença de galhos pequenos.</p>
	18	10 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro</p> <p>Estrutura: Terra fina com uma quantidade relevante de pedras pequenas. Presença de galhos</p>

			pequenos.
<p>Local: Parque Lago do Cortado</p> <p>Data de coleta: 07/03/2023</p> <p>Horário de coleta: 16h00 às 17h00</p> <p>Temperatura: 25°C</p> <p>Umidade relativa do ar: 74%</p>			
Ponto	N° da Amostra	Profundidade	Característica morfológica do solo
G	19	Superfície (0 cm)	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom claro avermelhado</p> <p>Estrutura: Terra fina com pequena quantidade de pedras de terra pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.</p>
	20	5 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom claro avermelhado</p> <p>Estrutura: Terra fina com pequena quantidade de pedras de terra pequenas.</p>
	21	10 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom claro avermelhado</p> <p>Estrutura: Terra fina com pequena quantidade de pedras de terra pequenas.</p>
H	22	Superfície (0 cm)	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro</p> <p>Estrutura: Terra fina com quantidade relevante de pedras de terra pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.</p>

	23	5 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro</p> <p>Estrutura: Terra fina com grande quantidade de pedras de terra pequenas. Presença de galhos pequenos.</p>
	24	10 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro</p> <p>Estrutura: Terra fina com grande quantidade de pedras de terra pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.</p>
<p>Local: Taguaparque</p> <p>Data de coleta: 07/02/2023</p> <p>Horário de coleta: 16h00 às 17h00</p> <p>Temperatura: 25°C</p> <p>Umidade relativa do ar: 75%</p>			
Ponto	N° da Amostra	Profundidade	Característica morfológica do solo
I	25	Superfície (0 cm)	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro avermelhado</p> <p>Estrutura: Terra fina com grande quantidade de pedras pequenas e médias. Presença de folhas e galhos pequenos.</p>
	26	5 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro avermelhado.</p> <p>Estrutura: Terra fina com grande quantidade de pedras pequenas e</p>

			médias. Presença de galhos pequenos.
	27	10 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro avermelhado</p> <p>Estrutura: Terra fina com grande quantidade de pedras pequenas e médias.</p>
J	28	Superfície (0 cm)	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro avermelhado</p> <p>Estrutura: Terra fina com quantidade relevante de pedras de terra pequenas. Presença de folhas e galhos pequenos.</p>
	29	5 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro avermelhado</p> <p>Estrutura: Terra fina com quantidade relevante de pedras de terra pequenas.</p>
	30	10 cm	<p>Horizonte: O</p> <p>Cor: Marrom escuro avermelhado</p> <p>Estrutura: Terra fina com quantidade relevante de pedras pequenas.</p> <p>Presença de galhos pequenos.</p>

Fonte: Do autor. Dados atmosféricos retirados do aplicativo Tempo

4.1.2. Isolamento de actinobactérias

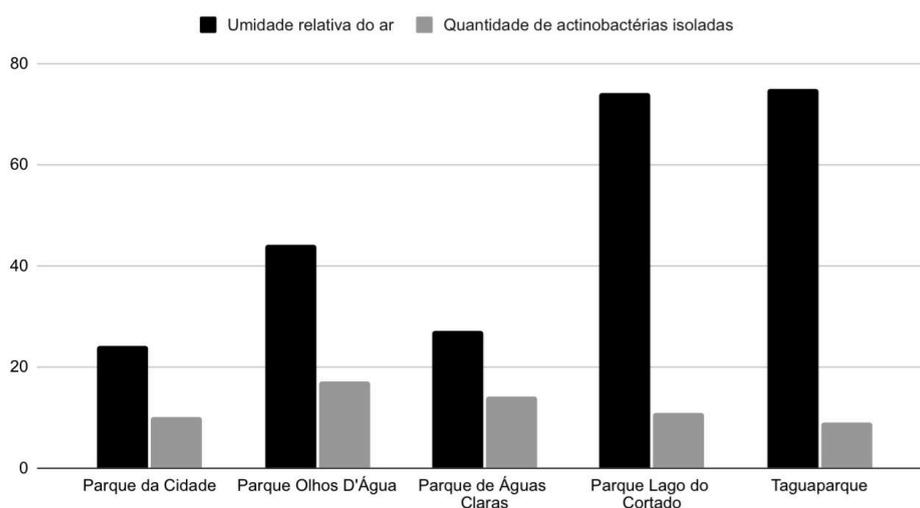
A diluição das amostras de solo resultou em placas com uma grande diversidade de actinobactérias (Quadro 1). As placas contendo o meio ISP-3, com maior variabilidade, foram aquelas provenientes dos locais: Parque da Cidade Dona Sarah Kubitschek (placas 1 a 6), Parque Olhos D'Água (placas 7 a 12) e o Parque Ecológico de Águas Claras (placas 13 a 18). Em contrapartida, os parques Lago do Cortado e

Taguaparque apresentaram menor variabilidade de actinobactérias, com exceção das placas 22 a 24.

Uma possível explicação para essa variação é a umidade relativa do ar, principalmente considerando a época em que as coletas foram realizadas. Vale ressaltar que das 4 coletas feitas no período chuvoso, as realizadas no Parque Olhos D'Água e Parque Ecológico de Águas Claras ocorreram no início da época chuvosa, enquanto as coletas no Parque Lago do Cortado e Taguaparque foram feitas no final desse período.

Apesar das placas de isolamento do Parque da Cidade apresentarem uma grande variedade aparente de actinobactérias, foi possível isolar somente 10 colônias para testes de atividade antimicrobiana e armazenamento devido a adversidades. Além disso, notou-se que o segundo ponto de coleta (H) do Parque Lago do Cortado apresentou placas com diversidade maior do que o esperado. Isso pode ser devido a vários fatores, como a presença de diversas árvores ao redor do ponto de coleta.

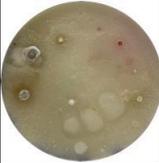
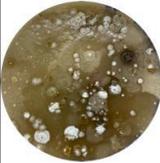
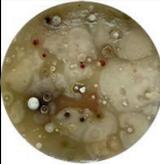
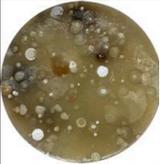
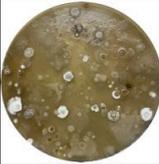
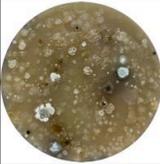
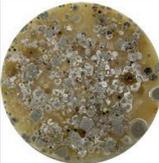
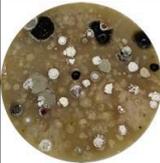
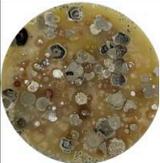
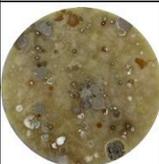
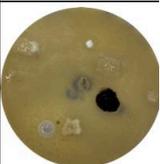
Gráfico 1: Representação da umidade relativa do ar e a quantidade de actinobactérias isoladas de cada local.



Fonte: Do autor.

Nos estudos realizados por Melz, Tiago (2009) e Pereira (2000), notou-se a ausência de actinomicetos no período chuvoso, possivelmente em relação ao aumento da umidade no solo, enquanto no período seco houve um aumento significativo na densidade dessas bactérias, devido a fatores como o déficit hídrico do solo. Há indícios que as actinobactérias necessitam de menor potencial hídrico para seu crescimento, ao contrário de outras bactérias (Melz; Tiago, 2009 *apud* Madigan, 2004)

Quadro 1: Placas de isolamento com actinobactérias de diferentes locais.

Parque da Cidade Dona Sarah Kubitschek								
	1	2	3	4	5	6		
	Parque Olhos D'Água							
		7	8	9	10	11	12	
		Parque Ecológico de Águas Claras						
			13	14	15	16	17	18
Parque Lago do Cortado								
			19	20	21	22	23	24
	Taguaparque							
			25	26a	27	28	29	30
								
			26b					

Fonte: Do autor.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS ACTINOBACTÉRIAS

4.2.1. Caracterização Micromorfológica

Ao analisar as características de 65 cepas isoladas, tendo como critério de diferenciação a coloração e o aspecto das actinobactérias, pôde-se classificar as cepas em 52 tipos cromogênicos (Tabela 3).

Tabela 3: Tipos culturais das cepas de actinobactérias isoladas a partir da pigmentação do micélio aéreo e vegetativo.

Tipos Culturais	Cepas	Micélio aéreo	Micélio reverso
1	1-C1	Branco e marrom esverdeado	Marrom esverdeado
	5-C2		
2	2-C4	Branco e creme	Creme
3	3-C3	Laranja	Laranja
4	3-C4	Branco	Indefinido
5	4-C2	Cinza	Marrom
6	6-C2	Cinza	Marrom sépia
	24-C1		
7	6-C3	Branco	Indefinido
	15-C1		
8	6-C4	Indefinido	Cinza amarelado
9	6-C5	Branco e cinza amarelado	Indefinido

10	7-C2	Cinza oliva	Indefinido
11	7-C3	Creme e marrom castanha	Marrom castanha
12	7-C5	Creme	Indefinido
13	8-C1	Vermelho	Indefinido
14	8-C2	Amarelo Mel	Amarelo Mel
15	8-C3	Cinza e marrom mogno	Marrom mogno
16	9-C1	Branco	Marrom castanha
17	9-C2	Branco	Grafite escuro
18	9-C3	Creme e marrom avermelhado	Marrom avermelhado
19	10-C1	Indefinido	Indefinido
20	10-C4	Amarelo limão e cinza	Marrom
21	10-C5	Branco	Creme e marrom mogno
22	11-C1	Bege	Indefinido
23	11-C2	Bege	Marrom esverdeado
24	11-C4	Branco	Marrom terra
25	11-C5	Cinza caqui	Marrom terra
26	11-C6	Branco	Creme
27	12-C1	Branco e preto	Indefinido

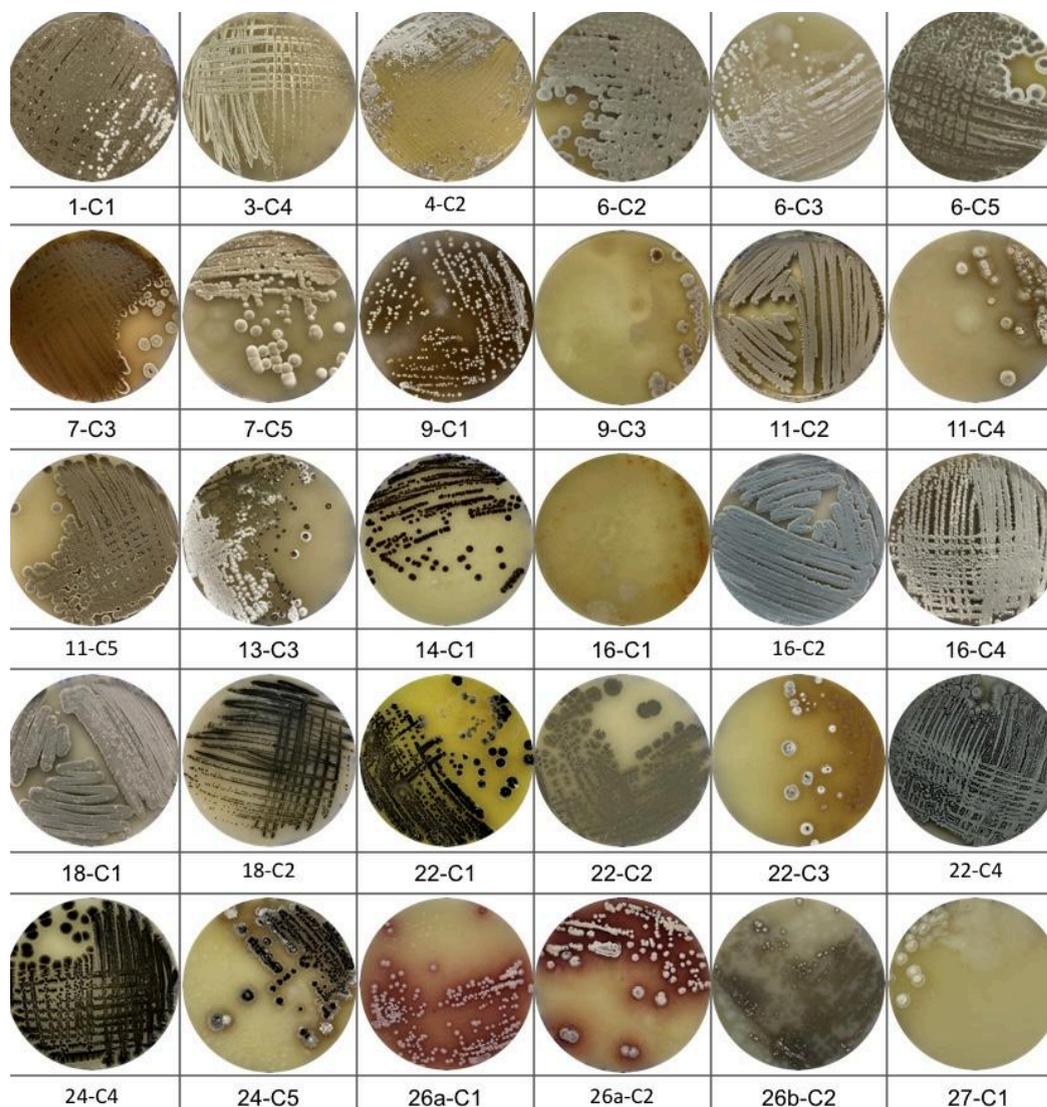
	14-C1		
28	12-C2	Branco e creme	Creme
29	12-C3	Creme	Indefinido
30	13-C2	Branco e preto	Marrom
31	13-C3	Branco e grafite escuro	Creme
32	14-C4	Branco	Creme
33	15-C2	Branco e vermelho rubi	Vermelho rubi
34	16-C1	Laranja	Laranja
35	16-C2	Azul pastel	Indefinido
36	16-C3 18-C2	Laranja e preto	Laranja e preto
37	16-C4	Branco	Marrom
38	17-C1	Branco e preto	Preto
39	17-C2 22-C4 24-C6 26a-C4	Azul pastel	Azul escuro
40	18-C1	Cinza oliva	Indefinido
41	18-C3	Branco e cinza castanho	Creme
42	21-C1 22-C2 24-C3	Cinza esverdeado	Indefinido

43	22-C1	Preto	Amarelo e preto
44	22-C3	Branco e laranja escuro	Laranja escuro
45	24-C2 24-C4	Preto	Preto
46	24-C5	Branco e preto	Laranja e preto
47	25-C2	Branco e cinza	Marrom
48	26a-C1 26a-C2 26b-C1	Rosa claro	Vermelho rubi
49	26b-C2	Branco	Cinza
50	27-C1	Branco	Indefinido
51	30-C1	Branco e preto	Indefinido
52	30-C2	Bordô	Bordô

Fonte: Do autor.

As actinobactérias possuem como característica taxonômica a produção de pigmentos que podem estar dissolvidos no meio em que se encontram ou retidos no micélio. A coloração pode variar entre diversos tons de azul, preto, amarelo, vermelho, rosa, verde, marrom e violeta (Ramos et al., 2015 *apud* Amal et al., 2011) (Quadro 2).

Quadro 2: Imagens selecionadas de 30 cepas de actinobactérias encontradas no Cerrado brasiliense. Diversidade de pigmentação do micélio aéreo.



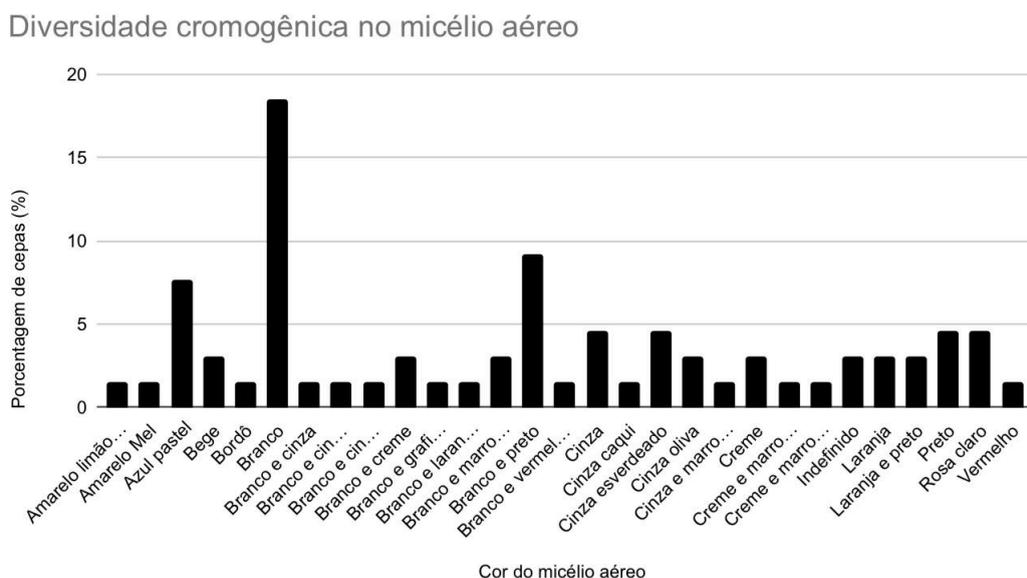
Fonte: Do autor.

Obteve-se 50 tipos culturais de actinobactérias com diferentes colorações (Tabela 3), não sendo possível definir a cor do micélio aéreo de 2 cepas (3,07%) e a cor do micélio vegetativo de 19 cepas (29,23%) (Gráfico 2 e 3). Sugere-se que a dificuldade em identificar a cor dessas 18 cepas pode ser atribuída à ausência de pigmentação no micélio vegetativo, como consta no estudo de Amsaveni et al. (2015) no qual 46% de 26 cepas de actinobactérias do solo da Índia não são produtoras de pigmentos.

Os pigmentos observados no micélio aéreo das cepas foram Amarelo limão e cinza (1,53%), Amarelo Mel (1,53%), Azul pastel (7,69%), Bege (3,07%), Bordô (1,53%), Branco (18,46%), Branco e cinza (1,53%), Branco e cinza amarelado (1,53%), Branco e cinza castanho (1,53%), Branco e creme (3,07%), Branco e grafite escuro (1,53%), Branco e laranja escuro (1,53%), Branco e marrom esverdeado (3,07%), Branco e preto (9,23%), Branco e vermelho rubi (1,53%), Cinza (4,61%), Cinza caqui (1,53%), Cinza esverdeado (4,61%), Cinza oliva (3,07%), Cinza e marrom mogno (1,53%), Creme (3,07%), Creme e marrom castanha (1,53%), Creme e marrom avermelhado (1,53%), Laranja (3,07%), Laranja e preto (3,07%), Preto (4,61%), Rosa claro (4,61%) e Vermelho (1,53%) (Gráfico 2).

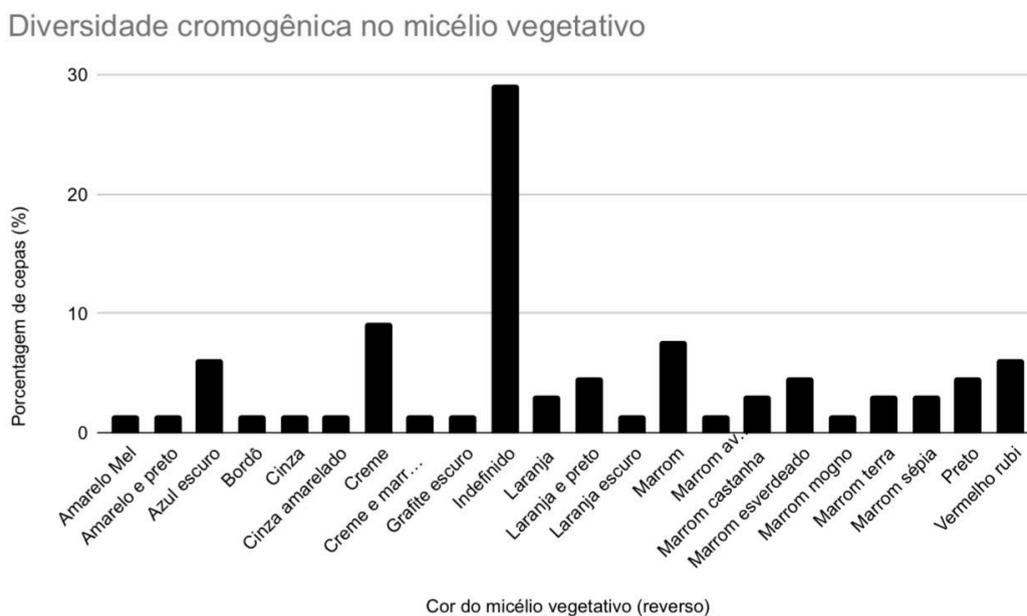
Já os pigmentos observados no micélio vegetativo das cepas foram Amarelo Mel (1,53%), Amarelo e preto (1,53%), Azul escuro (6,15%), Bordô (1,53%), Cinza (1,53%), Cinza amarelado (1,53%), Creme (9,23%), Creme e marrom mogno (1,53%), Grafite escuro (1,53%), Laranja (3,07%), Laranja e preto (4,61%), Laranja escuro (1,53%), Marrom (7,69%), Marrom avermelhado (1,53%), Marrom castanha (3,07%), Marrom esverdeado (4,61%), Marrom mogno (1,53%), Marrom terra (3,07%), Marrom sépia (3,07%), Preto (4,61%) e Vermelho rubi (6,15%) (Gráfico 3).

Gráfico 2: Porcentagem da coloração do micélio aéreo das cepas de actinobactérias do Cerrado brasileiro.



Fonte: Do autor.

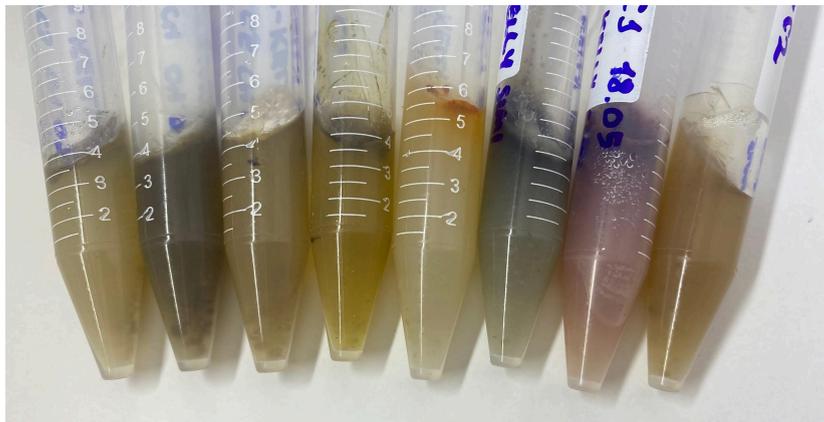
Gráfico 3: Porcentagem da coloração do micélio vegetativo das cepas de actinobactérias do Cerrado brasileiro.



Fonte: Do autor.

A coloração do micélio aéreo predominante nesta pesquisa foi branco (18,46%) (3-C4, 6-C3, 9-C1, 9-C2, 10-C5, 11-C4, 11-C6, 14-C4, 15-C1, 16-C4, 26b-C2 e 27-C1), seguido por variações de cinza (ao todo 15,35%) (4-C2, 6-C2, 7-C2, 8-C3, 11-C5, 18-C1, 21-C1, 22-C2, 24-C1 e 24-C3) e azul pastel (7,69%) (16-C2, 17-C2, 22-C4, 24-C6 e 26a-C4). Totalizando 12 cepas com a pigmentação branca, entretanto, vale ressaltar que outras 15 cepas apresentaram a coloração branca junto com outras pigmentações. Apesar de muitos pigmentos estarem em menor porcentagem, os 52 tipos culturais demonstram uma variedade cromogênica significativa no Cerrado brasileiro. Vale destacar que segundo Amal et al. (2011) o meio pode influenciar na produção de pigmentos por fatores como o pH, temperatura de crescimento, aeração e fonte de nitrogênio.

Figura 2: Isolamento em tubo falcon com meio ISP-3 sólido de actinobactérias.



Fonte: Do autor.

Legenda: Diversidade de pigmentação do micélio aéreo e vegetativo com as colônias 13-C3, 16-C4, 7-C5, 22-C1, 16-C1, 22-C4, 26a-C1 e 25-C5, respectivamente.

4.2.2. Caracterização Micromorfológica

A análise micromorfológica foi realizada utilizando o método de microcultivo descrito por Shirling e Gottlieb (1966) (Figura 3), para a identificação das cepas de actinobactérias em nível de gênero. A técnica envolveu a análise micromorfológica do esporóforos, além da confirmação das cepas como actinobactérias, através da coloração Gram. Essa identificação foi comparada através de imagens do Atlas de Actinomicetos 2, publicado pela Sociedade Japonesa de Actinomicetos (Tabela 4).

Foram selecionadas 18 cepas de actinobactérias para a análise micromorfológica. Dessas, 14 cepas (77,77%) identificadas como possíveis *Streptomyces*. A cepa 6-C4 (5,55%) foi identificada como possível *Nonomuraea*, a cepa 18-C1 (5,55%) como possível *Nocardia* e as cepas 22-C1 e 24-C4 (11,11%) como possíveis *Actinokineospora*.

As actinobactérias são bactérias gram-positivas com organização filamentosa, formando longos filamentos finos e ramificados. Foi observado nos estudos de Silva M. (2012) e Williams et al. (1989) que esses filamentos podem originar

cadeias de esporos em formatos espirais variados, sendo eles curtos, verticilados e longos.

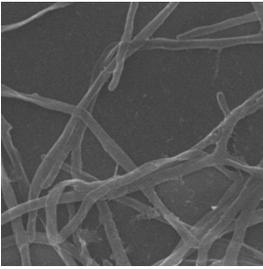
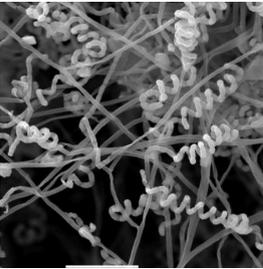
As caracterizações micromorfológicas foram realizadas para identificar os possíveis gêneros de cada actinobactéria. Para confirmação dessas classificações, é necessário fazer uma avaliação a nível molecular, viabilizada para pesquisas posteriores utilizando o banco.

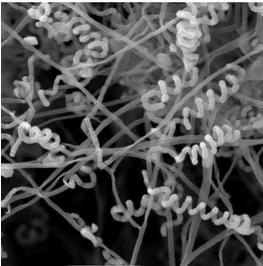
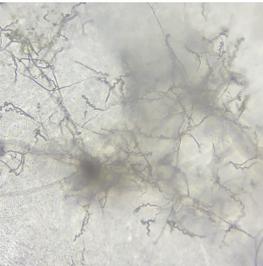
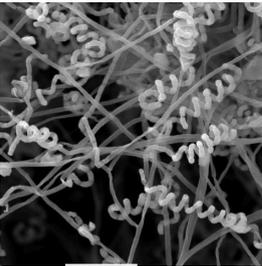
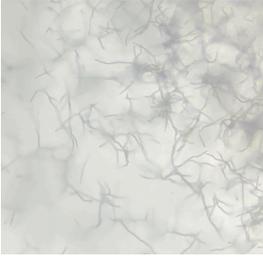
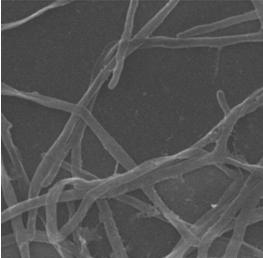
Figura 3: Microcultivo da cepa 5-C2 no meio ISP-3 contendo lamínulas.

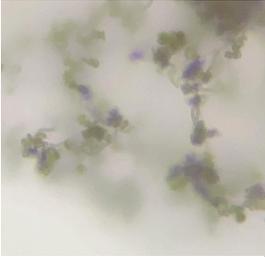
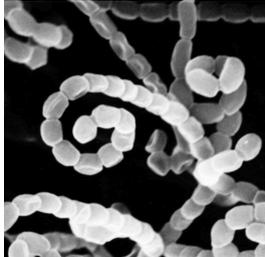
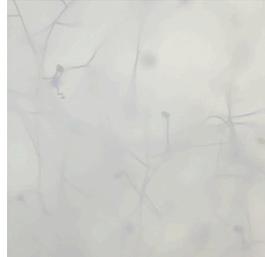
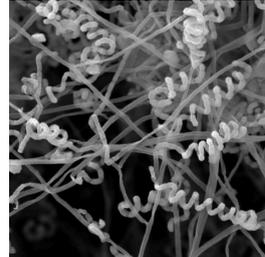
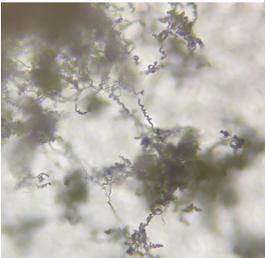
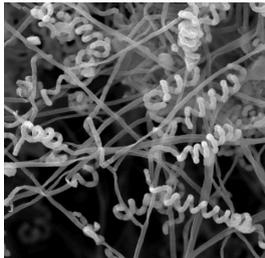
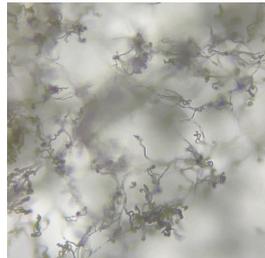
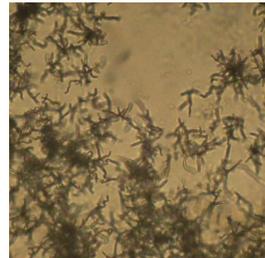


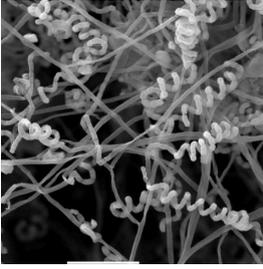
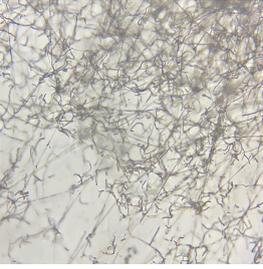
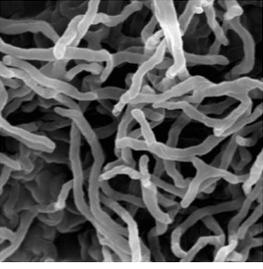
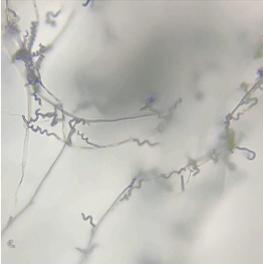
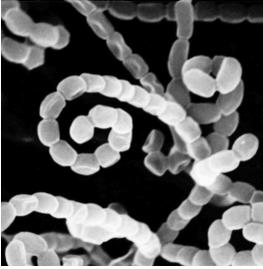
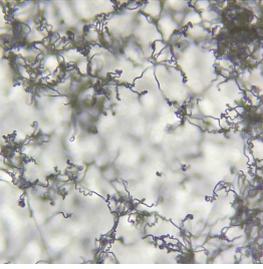
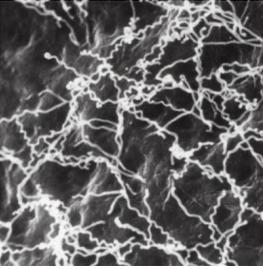
Fonte: Do autor

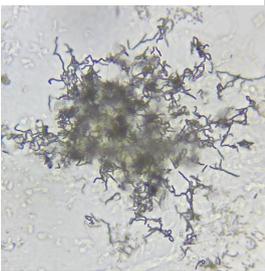
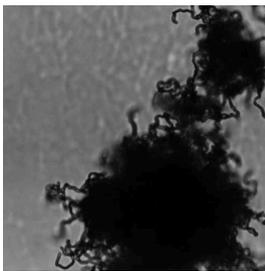
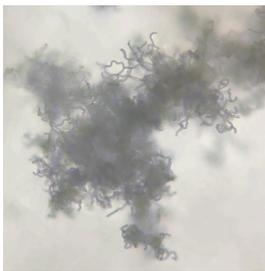
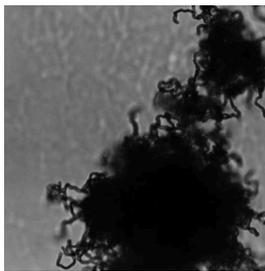
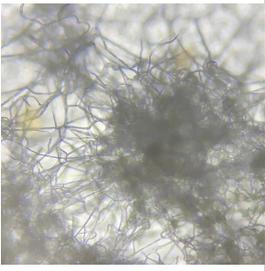
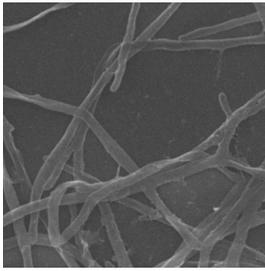
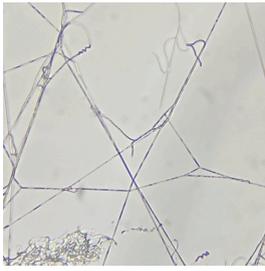
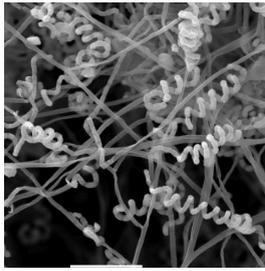
Tabela 4: Registro fotográfico das estruturas micromorfológicas de actinobactérias do Cerrado brasileiro.

Micromorfologia de 18 colônias de actinobactérias do Cerrado Brasileiro			
			
3-C4 Possíveis gêneros:	Atlas de Actinomicetos	4-C2 Possíveis gêneros:	Atlas de Actinomicetos

<p><i>Streptomyces / Nocardioides</i></p>	<p>- <i>Streptomyces</i> sp. U3 Section: 8 - No: 110</p>	<p><i>Streptomyces / Nonomuraea</i></p>	<p>- <i>Streptomyces hyaluromycini</i> MB-P013^T Section: 8 - No: 111</p>
			
<p>5-C2 Possível gênero: <i>Streptomyces</i></p>	<p>Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces hyaluromycini</i> MB-P013^T Section: 8 - No: 111</p>	<p>6-C2 Possível gênero: <i>Streptomyces</i></p>	<p>Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces hyaluromycini</i> MB-P013^T Section: 8 - No: 111</p>
			
<p>6-C3 Possíveis gêneros: <i>Streptomyces / Nocardioides</i></p>	<p>Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces</i> sp.</p>	<p>6-C5 Possível gênero: <i>Streptomyces</i></p>	<p>Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces</i></p>

	U3 Section: 8 - No: 110		<i>hyaluromycini</i> MB-P013 ^T Section: 8 - No: 111
			
7-C3 Possível gênero: <i>Streptomyces</i>	Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces</i> sp. OM-4842 Section: 8 - No: 76	7-C5 Possíveis gêneros: <i>Streptomyces</i> / <i>Nonomuraea</i>	Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces hyaluromycini</i> MB-P013 ^T Section: 8 - No: 111
			
11-C2 Possíveis gêneros: <i>Streptomyces</i> / <i>Nonomuraea</i>	Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces hyaluromycini</i> MB-P013 ^T	11-C5 Possível gênero: <i>Streptomyces</i>	Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces cyaneogriseus</i> NBRC 13437 ^T

	Section: 8 - No: 111		Section: 8 - No: 15
			
14-C1 Possível gênero: <i>Streptomyces</i>	Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces hyaluromycini</i> MB-P013 ^T Section: 8 - No: 111	16-C4 Possível gênero: <i>Nonomuraea</i>	Atlas de Actinomicetos - <i>Nonomuraea syzygii</i> GKU 164 ^T Section: 9 - No: 91
			
17-C2 Possíveis gêneros: <i>Streptomyces</i> / <i>Nocardia</i>	Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces</i> sp. OM-4842 Section: 8 - No: 76	18-C1 Possíveis gêneros: <i>Nocardia</i> / <i>Streptomyces</i>	Atlas de Actinomicetos - <i>Nocardia brasiliensis</i> IFO 15008 Section: 1 - No: 18

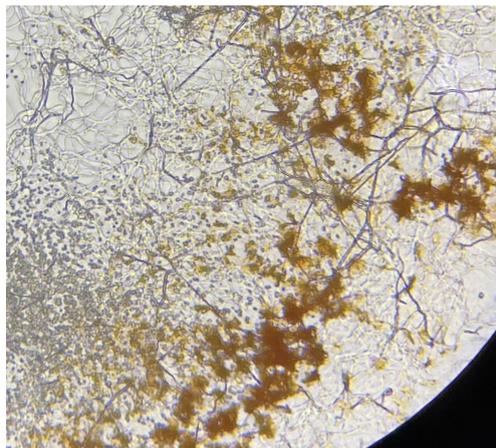
			
<p>22-C1 Possível gênero: <i>Actinokineospora</i></p>	<p>Atlas de Actinomicetos - <i>Actinokineospora riparia</i> C-39162 Section: 7 - No: 16</p>	<p>24-C4 Possíveis gêneros: <i>Actinokineospora</i> / <i>Streptomyces</i></p>	<p>Atlas de Actinomicetos - <i>Actinokineospora riparia</i> C-39162 Section: 7 - No: 16</p>
			
<p>24-C5 Possíveis gêneros: <i>Streptomyces</i> / <i>Nonomuraea</i></p>	<p>Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces</i> sp. U3 Section: 8 - No: 110</p>	<p>26a-C2 Possível gênero: <i>Streptomyces</i></p>	<p>Atlas de Actinomicetos - <i>Streptomyces hyaluromycini</i> MB-P013^T Section: 8 - No: 111</p>

Fonte: Imagens das colônias retiradas pelo o Autor. Imagens comparativas retiradas do Atlas de Actinomicetos 2.

As actinobactérias sintetizam e excretam corantes, como os pigmentos melanóides, que são polímeros de coloração marrom escuro de melanina semelhantes

às substâncias húmicas presentes no solo. Essa característica também desempenha um papel importante na taxonomia (Dastager et al., 2006). Durante a caracterização micromorfológica, foi observado a presença de pigmentos melanóides em 2 cepas bacterianas, sendo elas: 24-C4 e 24-C5.

Figura 4: Presença de pigmento melanóide na colônia 24-C5.



Fonte: Do autor.

4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

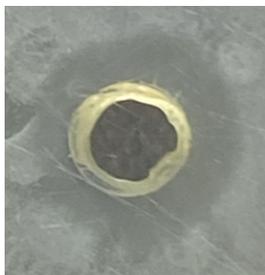
A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando o método de perfuração em Ágar Mueller Hinton com 4 tipos diferentes de cepas bacterianas. Este método permite a difusão de metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias no meio de cultura, resultando na inibição do crescimento de microrganismos, o que pode ser visualizado pela formação de um halo transparente ao redor da perfuração.

Foram utilizadas somente 61 colônias de actinobactérias, excluindo as cepas 6-C4, 8-C1, 16-C3 e 26b-C1. O teste revelou que 7 linhagens (11,47%) apresentaram atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* após um período de 16 horas, formando halos de inibição com diâmetros variando entre 1 mm a 10 mm (Figura 5). Apresentaram halos de inibição as cepas 22-C1 (3mm) contra *Enterococcus faecalis* e 16-C1 (1mm), 2-C4 (1mm), 10-C4 (2mm), 12-C1 (4mm), 4-C2 (4mm) e 14-C4 (10mm) contra *Staphylococcus aureus*. Contudo, o teste mostrou que

54 linhagens (88,52%), das 61 cepas de actinobactérias testadas, não demonstraram atividade antimicrobiana.

Pesquisadores sugerem que fatores como temperatura, meio de cultura e condições de cultivo podem impactar na produção de metabólitos secundários das actinobactérias (Santana, 2015 *apud* Shahat et al., 2011; Nohoh et al., 2010). Portanto, há possibilidade de que as cepas testadas neste trabalho possam apresentar atividade antimicrobiana sob diferentes condições.

Figura 5: Exemplo de halo de inibição. Linhagem: 22-C1 (3mm) contra *Enterococcus faecalis*.



Fonte: Do autor.

4.4. BANCO DE ACTINOBACTÉRIAS

A coleção é essencial para facilitar o acesso de outros pesquisadores às actinobactérias. Foi estabelecido um banco de actinobactérias em dois formatos: (1) o isolamento de colônias em tubos falcon contendo meio ISP-3 sólido e (2) conservação das células bacterianas com óleo mineral.

As colônias são mantidas sob refrigeração, mas não há informações específicas sobre a durabilidade do banco e ou o tempo necessário para fazer sua manutenção. Recomenda-se que, ao consultar o banco, sejam produzidas replicações das colônias para análises.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferentes colorações observadas indicaram uma elevada diversidade cromogênica das actinobactérias presentes do solo do Cerrado. A caracterização realizada identificou 52 tipos cromogênicos de actinomicetos, incluindo cepas com potencial para a produção de pigmentos de interesse industrial. Foi analisado que as cores branco, cinza e azul pastel foram predominantes na pigmentação dos micélios aéreos, enquanto as cores marrom e creme prevaleceram na pigmentação dos micélios vegetativos.

Através da técnica de microcultivo, observou-se uma possível maior ocorrência de *Streptomyces* nas cepas analisadas. O presente trabalho realizou a análise microscópica para possíveis gêneros de actinobactérias, para a confirmação destes, deve-se realizar a análise molecular.

As linhagens 16-C1, 2-C4, 10-C4, 22-C1, 12-C1, 4-C2 e 14-C4 de actinobactérias demonstraram boa atividade antimicrobiana em frente às cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Os resultados apresentaram serem promissores para o uso da atividade antimicrobiana na indústria, indicando o potencial dessas cepas para o desenvolvimento de antibióticos. Além disso, a caracterização morfológica em tipos cromogênicos facilitará futuras pesquisas e estudos sobre a comunidade bacteriana presente no Cerrado brasiliense. O banco de actinobactérias oferece uma capacidade significativa para a obtenção de novos dados morfológicos e avaliação de diferentes potenciais das actinobactérias.

REFERÊNCIAS

ALVES DIAS, P.; TEIXEIRA SILVA, D.; DIAS TIMM, C. **Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de Kefir**. *Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science*, Goiânia, v. 19, p. 1–8, 2018.

AMAL, Ali et al.. **Selection of pigment (Melanin) production in Streptomyces and their application in printing and dyeing of wool fabrics**. *Research Journal of Chemical Sciences*, v.1, n.5, p. 22-28, 2011.

AMARAL, S. dos S., SILVA, A. C. R. da S. e, SALES, L. A. T., ALVES, C. S., MIRANDA, R. de C. M. de, NASCIMENTO, L. C. S., & ALVES, M. S. (2020). **POTENCIAL DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ACTINOMICETOS CONTRA O FUNGO *Cryptococcus gattii***. *Interfaces Científicas - Saúde E Ambiente*, 8(2), 95–104.

AZUMA, M.V. P. **ACTINOBACTÉRIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR, BRASIL**. 2011. págs. 95. Dissertação apresentada ao Programa de Pós - graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica. Universidade Federal do Paraná.

AMSAVENI, R. et al.. **Screening and isolation of pigment producing Actinomycetes from soil samples**. *International Journal of Biosciences and Nanosciences*. v.2, n.2, p. 24-28, 2015.

ARAÚJO, J.M. **Plasmídios conjugativos e fusão de protoplastos em Streptomyces Jelleus**. 1990. págs. 178. Tese apresentada à Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

As cores.... **LISTA COM AS 213 CORES RAL CLASSIC**. Ral Clour, 2015. Disponível em: <https://ral-colours.com.br/wp-content/uploads/2015/03/Lista-de-cores-Ral.pdf>. Acesso em 04 de agosto de 2024.

BALDRIAN, P. Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, p-109-130. 2017.

BARBOSA, Werley. **BIOPROSPECÇÃO - Aspectos Jurídicos e o Procedimento Administrativo que Possibilita a Bioprospecção no Brasil**. 2009. Dissertação (Mestrado em Direito) - Faculdade de Direito, Universidade Católica de Santos, Santos, 2009.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M.. **Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method**. *American Journal of Clinical Pathology*. 1966. Vol. 45(4_ts):493-496.

BRITO, Francisca. **DIVERSIDADE CROMOGÊNICA DE ACTINOBACTÉRIAS DO SOLO DE**

QUIXADÁ - UMA REGIÃO DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO. **Realize Editora**, Campina Grande, novembro. 2016.

CARLOS, Raphael. **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS DA COLEÇÃO UFPEDA CONTRA *Candida spp.***. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

CATTELAN, A. J.; VIDRO, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 133-142, 1990.

CBC ICMBIO-MMA. **Biodiversidade do Cerrado**. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cbc/conservacao-da-biodiversidade/biodiversidade.html>. Acesso em 03 de maio de 2023.

CHEQUER, L.P. T.; CRAPEZ, M.A.C.; FONTANA, L.F.; SILVA, F.S.; **Efeito Rizosfera: Simbiose entre raízes de plantas e bactérias**. Revista Educação Pública. 2011. págs. 5. Tese de pós-graduação em Biologia Marinha e Geologia, Universidade Federal de Fluminense e UFRJ, Rio de Janeiro. Revista Educação Pública.

CORREIA, M.E.F.; OLIVEIRA, L.C.M. de. Fauna de Solo: Aspectos Gerais e Metodológicos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, fev. 2000. 46p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 112).

CUTCHMA, T.R.. BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS COM ATIVIDADE LIGNOCELULOLÍTICA PARA PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR. 2019. págs. 77. Dissertação para um programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos.

DASTAGER, S. G.; WEN-JUN, L.; DAYANAND, A.; SHU-KUN, T.; XIN-PENG, T.; XIAO-YANG, Z.; LI-HUA, X.; CHENG-LIN, J. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 8, p. 1131-1134, 2006.

DOUMBOU, C. et al. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*, 82, p.85-102, março de 2002.

DUARTE, M.W. et. al. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo. Produção de metabólitos secundários por actinomicetos de solo**. 2009. p. 33. Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas na forma de Artigo Científico. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre. 2009.

EITEN, G. Vegetação do Cerrado. In: PINTO, M. N. (Org.) **Cerrado: Caracterização**,

ocupação e perspectivas (2a ed.). Brasília: UnB/Sematec, 1993.

EMBRAPA. **Propriedades do Solo**. Embrapa, s.d.. Disponível em: <https://www.embrapa.br/solos/sibcs/propriedades-do-solo#:~:text=Caracter%C3%ADsticas%20morfol%C3%B3gicas%20do%20solo>. Acesso em: 3 de março de 2024.

FAGERIA, N. K., STONE, L.F., 1999. **Manejo da acidez dos solos de cerrado e de várzea do Brasil**. Embrapa. 42.

FERREIRA, H.K.L. et. al. **Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano de Streptomyces sp G-27 contra microrganismos de interesse clínico**. 31 de dezembro de 2016. v. 3, n. 6, p. 367-373. Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade. Universidade Federal de Pernambuco. 2016.

FERREIRA, Maria. **Atividade antimicrobiana de extratos aquosos de plantas medicinais sobre bactérias causadoras de doenças de origem alimentar**. 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

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

HEINE, Gabriela; SCHAFFER DE MARTINI SOARES, Fabiana Andreia. BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS AUTÓCTONES PARA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS E NA ÁREA FARMACÊUTICA. **Revista Farmácia Generalista / Generalist Pharmacy Journal**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 40–52, 2022.

HEUSER, C. A. **Projeto de Banco de Dados**, 5a. ed. Sangra Luzatto, 2004.

HIGASHI, S. 1; HUNGRIA, M. **Criação do Banco de Dados de “Coleção de Culturas E de Genes de Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas”**. 2006. págs. 197. III Jornada Acadêmica da Embrapa Soja. Universidade Federal de Londrina.

HOYOS, H.A.V. Actinobactérias de biomas brasileiros: biodiversidade e potencial de uso na agricultura. 2018. págs. 130. Tese apresentada para obtenção de título de Doutor em Ciências, Microbiologia Agrícola. Universidade de São Paulo. São Paulo, Piracicaba.

IBGE. 2004. **Mapa de biomas do Brasil, primeira aproximação. Rio de Janeiro**. IBGE, 2004. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 04 de agosto de 2024.

IPAM. CERRADO: Como o desmatamento do Cerrado agrava o super aquecimento global e a seca. IPAM - Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia, s. d.. Disponível em: <https://ipam.org.br/como-atuamos/biomas/cerrado/>. Acesso em: 14 de agosto de 2024.

JACOBSEN, C. N., et. al. **Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of Lactobacillus spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans.** American Society for Microbiology. v. 65. p. 4949 - 4956. 1 de novembro de 1999.

JARLINE, Ingride. **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESPÉCIES DOS GÊNEROS Streptomyces E Bacillus ISOLADOS DOS RIOS MADEIRA E PURUS PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA.** 2021. Dissertação (Mestrado em Agricultura em Trópico Úmido) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2021.

JESUS, J.A. **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS PARA O CRESCIMENTO DE PLANTAS.** 2013. págs. 88. Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes - Rio de Janeiro.

JUNIOR, Fábio; MENDES, Iêda. **Biomassa Microbiano do Solo,** 2007. 40p. Documentos - Embrapa Cerrados, Planaltina, 2007.

LAMBERT, B. et al. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 53, p. 1866-1871, 1987.

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

LETEK, M. et al. Cytoskeletal proteins of actinobacteria. **International Journal of Cell Biology,** 2012.

LIMA, M. R. **Perfil e morfologia do solo.** In: **Abordando o solo na escola: para professores do ensino fundamental e médio.** Curitiba: Secretaria Estadual de Educação do Paraná, Universidade Federal do Paraná/Programa Solo na Escola-UFPR, 2016. 24 p.

LIMA, V.T. **ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS E DA RIZOSFERA DE MELÃO-DE-SÃO CAETANO (Momordica charantia L.).** 2006. págs. 80. Dissertação apresentada ao programa de pós graduação em biotecnologia. Universidade Federal de Pernambuco.

MALIEHE, T. S. et al. **Bioprospecting of endophytic actinobacterium associated with Aloe ferox mill for antibacterial activity.** **BMC Complementary Medicine & Therapies,** v. 22, n. 1, p. 1–12, 2022.

MARTINS, Ismael; CONEGLIAN, Ademilson. **SITUAÇÃO E PERSPECTIVAS DA CONSERVAÇÃO DO CERRADO EM 2019.** **Agrotecnologia,** Ipameri, v.11, n.1, p.16-22, janeiro/julho. 2020.

MELO, F. M. P. **BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS DE MILHO (ZEA MAYS L.) COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**. 2009. págs 105. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo. 2009.

MELZ, E. M.; TIAGO, P. V. Propriedade físico-químicas e microbiológicas do solo de um Parque em Tangará da Serra, MT, uma área de transição entre Amazônia e Cerrado. *ACTA AMAZONICA*, Manaus, v. 39, n. 4, p. 835-842, 2009.

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

MEURER, E.; TIAGO, P. **Propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo de um Parque em Tangará da Serra**, MT, uma área de transição entre Amazônia e Cerrado. v. 39, n. 4, p. 829–834, 2009.

MIRANDA, I. S.; ABSY, M. L. Fisionomia das savanas de Roraima, Brasil. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 30, n. 3, p. 423-440, 2000.

MORAIS, Maria. **Bactérias do Bem: Pesquisa investiga produção de bioativos por actinobactérias da Amazônia**. Universidade Federal do Oeste do Pará, 2016. Disponível em: http://www2.ufopa.edu.br/ufopa/divulgacao_cientifica/bacterias-do-bem-pesquisa-investiga-producao-de-bioativos-por-actinobacterias-da-amazonia. Acesso em: 5 mar. 2024.

NIMER, E. **Climatologia do Brasil**. Rio de Janeiro. IBGE, 1989.

NETO, P.J.F. **Isolamento e purificação parcial de L-asparaginase produzida por actinobactéria em solo do Cerrado**. 2015. págs. 91. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro, Universidade Federal de Goiás.

NUNES, Camila. **Avaliação de Atividades Antifúngica e Imunomoduladora de Isolados de Actinobactérias da Rizosfera de *Solanum Lycocarpum***. 2020. p. 92.. Pós-Graduação em Biologia Animal - Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

O clima.... **CLIMA**. Exposição Cerrado - Patrimônio dos Brasileiros, s. d.. Disponível em: <http://cerrado.museuvirtual.unb.br/index.php/meios/clima>. Acesso em: 11 de agosto de 2024.

OLIVEIRA, A.P.G; SABINO S.M.; GANDINE S.M; MOULIN, S.; AMARAL, A.A. **IMPORTÂNCIA DAS ACTINOBACTÉRIAS EM PROCESSOS ECOLÓGICOS, INDUSTRIAIS E ECONÔMICOS**, 2014. v. 10. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo – Campus de Alegre, ES. 2014.

OLIVEIRA, Mônica. **Bioprospecção de bactérias com potencial biotecnológico para biorremediação e monitoramento de praias impactadas da Baía de Guanabara/RJ**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2011.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, jun. 2008.

Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada -Oitava Edição. [s.l: s.n.].

PEREIRA, J.C. 2000. **Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera**. Embrapa Agrobiologia, Seropédica. p. 15.

PIMENTEL, Ida et. al.. **Guia Prático de Biologia do Solo**.1 ed. Curitiba - PR, 2016. Embrapa.

PLASTLABOR, A. **Dicas para armazenamento de meios de cultura – Plastlabor**. Disponível em: <<https://plastlabor.com.br/noticias/dicas-armazenamento/>>. Acesso em: 5 mar. 2024.

RAMOS, K. et al. CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE CROMOGÊNICA DE ACTINOBACTÉRIAS DE UM NICHOS MICROBIANO PRESERVADO NO BIOMA CAATINGA. [s.l: s.n.]. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 2125, 2015.

RANJANI, A.; DHANASEKARAN, D.; GOPINATH, P. M. An Introduction to Actinobacteria. **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications**. p.3-37, 2016.

RIBEIRO; WALTER. **Bioma Cerrado**. Porta Embrapa, s.d. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cerrados/colecao-entomologica/bioma-cerrado>. Acesso em: 05 de julho de 2024.

SANAIOTTI, T. M. Ecologia de paisagens: savanas amazônicas In: VAL, A. L.; FIGLIUOLO, R.; FELDBERG, E. (Ed.). **Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia: fatos e perspectivas**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1991. v. 1, p. 77-79.

SANTANA, Raphael. **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS DA COLEÇÃO UFPEDA CONTRA *Candida spp.*** 2015. p. 68.. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SANTOS, L. DA S. et al. Actinobactérias com potencial biotecnológico agrícola isoladas de adubo orgânico fermentado (Bokashi). **Diversitas Journal**, v. 6, n. 4, p. 3866–3881, 2021.

SALEEM, M. et al. **Bioprospecting of desert actinobacteria with special emphases on griseoviridin, mitomycin C and a new bacterial metabolite producing Streptomyces sp. PU-KB10-4**. *BMC microbiology*, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 69,2023.

SAPKOTA, A. et al. Isolation, Characterization, and Screening of Antimicrobial-Producing Actinomycetes from Soil Samples. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1–7, 27 mar. 2020.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. **Methods for Characterization of Streptomyces species**. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Iowa, England, v. 16, p. 313-340, 1966.

SILVA, A. D.; ARAÚJO, J. M.; CUNHA, I. G. B.. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DA Ipomoea pescaprae (L.) R. Br.** 2011. p.24.. Faculdade Pernambucana de Saúde, Pernambuco, 2011.

SILVA, G. R. BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE *Caesalpinia pyramidalis* Tul. DO BIOMA CAATINGA. 2013. págs. 93. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco.

SILVA, M.S. **Identificação de actinobactérias em solos de cerrado mineiro durante a estação de baixa pluviosidade**. 2012. págs 98. Tese de pós graduação em Microbiologia , Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2012.

Society for Actinomycetes Japan. **Atlas of Actinomycetes 2**. Digital Atlas of Actinomycetes 2, 2015. Disponível: <https://atlas.actino.jp>. Acesso em: 31 de julho de 2024.

SOUSA, Djalma , LOBATO, E. Cerrado. **Correção do Solo e Adubação**. 2 ed. Brasília - DF. Embrapa. 2004.

UESUGI, J.H.E; FERNANDES, C.F.; SILVA, J.C.C; BATISTA, F.M.; OLIVEIRA, F.S; CARVALHO, B.F.; BEZERRA, N.V.;. *Brazilian Journal of Development*. 2021., v.7, n.6, p. 59453-59460.

WILLIAMS, S. T.; CROSS, T. **Actinomycetes (Chapter XI)**. *Methods Microbiol*, 4: 295-334. 1971

WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Williamns e Wilkins, v. 4, 1989, 2648 p.