

**bactérias endofíticas de samambaias com potencial antagônico contra a bactéria  
*streptococcuspyogenes*(rosenbach, 1884)**

**bacterias endofíticas de helecho con potencial antagônico contra  
lasbacterias*streptococcuspyogenes* (rosenbach, 1884)**

**fern endophytic bacteria with antagonic potential against the bacteria  
*streptococcuspyogenes*(rosenbach, 1884)**

**Queila Sintia Neles da Silva\***  
queilaneles@gmail.com

**Maria Lucidalva Ribeiro de Sousa\***  
dalva\_1985@hotmail.com

**Adriana Dantas Gonzaga de Freitas\***  
adrianadantas1@gmail.com

\*Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brasil

---

## Resumo

Evolutivamente as plantas vêm desenvolvendo complexos mecanismos adaptativos, muitos desses somente possíveis, graças às interações com os microrganismos e com isso, as plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano que pode conferir ao seu hospedeiro maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas. A presente pesquisa tem por objetivo estudar a potencialidade da atividade antagônica entre bactérias endofíticas da Samambaia como controle biológico, frente à cepa de *Streptococcus pyogenes*. Foi utilizado o método de coloração de Gram, identificação molecular e de difusão em ágar por meio da técnica de semeadura de superfície e observado por três dias. Das dez bactérias endofíticas obtidas, quatro obtiveram resultado significativo em relação as demais testadas, são elas B1, B2, B3 e B4. Observou-se que, apesar de desenvolver halos de inibição a partir dos isolados das bactérias endofíticas, as que mais se diferiu foram a B4 e a B3, obtendo-se 5,29 e 4,27mm de crescimento dos seus respectivos halos em relação a B2 e a B1 frente a *S. pyogenes*. A partir do sequenciamento percebeu-se a presença de *Burkholderiasp.* como microrganismos endofíticos associados a samambaia. Estudos com a utilização de bactérias endofíticas como ferramenta para o controle biológico tem crescidos. Portanto, este trabalho tem como contribuição a compreensão das interações endófitos da planta samambaia, e com isso abrir novas perspectivas sobre o potencial biotecnológico dos microrganismos de plantas da Amazônia, praticamente inexplorada neste campo.

PALAVRAS CHAVE: Endofítica. Samambaias. *Streptococcus pyogens*. Antagonismo.

## Abstract

In evolution, plants have been developing complex adaptive mechanisms, many of which are only possible thanks to interactions with microorganisms, and with this, plants constitute a true microbial ecosystem that can provide their host with greater resistance to stress conditions, changes in physiological conditions. The present research aims to study the potential of antagonistic activity between endophytic fern bacteria as a biological control against the strain of *Streptococcus pyogenes*. The Gram identification method, molecular identification and agar diffusion using the surface seeding technique were used and observed for three days. Of the ten endophytic bacteria obtained, four obtained a significant result in relation to the others tested, they are B1, B2, B3 and B4. It was observed that, despite the development of inhibition halos from the endophytic bacteria isolates, the ones that most differed were B4 and B3, obtaining 5.29 and 4.27 mm of growth of their respective halos in relation to B2 and B1 against *S. pyogenes*. From the sequencing, the presence of *Burkholderia* sp. as endophytic microorganisms associated with fern. Studies with the use of endophytic bacteria as a tool for biological control have grown. Therefore, this work has as a contribution the understanding of the endophytic interactions of the fern plant, and with that to open new perspectives on the biotechnological potential of the microorganisms of Amazonian plants, practically unexplored in this field.

**KEYWORDS:** endophytic, *streptococcus pyogenes*, antagonism.

## **Resumen**

En la evolución, las plantas han ido desarrollando complejos mecanismos adaptativos, muchos de los cuales solo son posibles gracias a las interacciones con los microorganismos, y con ello, las plantas constituyen un verdadero ecosistema microbiano que puede dotar a su huésped de una mayor resistencia a las condiciones de estrés, cambios en las condiciones fisiológicas. La presente investigación tiene como objetivo estudiar el potencial de actividad antagonista entre bacterias endófitas de helechos como control biológico contra la cepa de *Streptococcus pyogenes*. La tinción de Gram, la identificación molecular y el método de difusión en agar se utilizaron utilizando la técnica de siembra superficial y se observaron durante tres días. De las diez bacterias endófitas obtenidas, cuatro obtuvieron un resultado significativo en relación a las demás ensayadas, son B1, B2, B3 y B4. Se observó que, a pesar del desarrollo de halos de inhibición a partir de los aislados de bacterias endófitas, los que más se diferenciaron fueron B4 y B3, obteniendo 5.29 y 4.27 mm de crecimiento de sus respectivos halos en relación a B2 y B1 contra *S. pyogenes*. A partir de la secuenciación, la presencia de *Burkholderia* sp. como microorganismos endófitos asociados a helechos. Los estudios con el uso de bacterias endófitas como herramienta de control biológico han crecido. Por lo tanto, este trabajo tiene como aporte la comprensión de las interacciones endófitas de la planta del helecho, y con ello abrir nuevas perspectivas sobre el potencial biotecnológico de los microorganismos de las plantas amazónicas, prácticamente inexplorado en este campo.

**PALABRAS CLAVE:** Endófito. Helechos *Streptococcus pyogenes*. Antagonismo.

---

## **INTRODUÇÃO**

Os microrganismos endofíticos residem no tecido da planta no qual hospeda-se, podendo levar a ter com essa planta uma relação simbiótica ou até mesmo patogênicas. Através dessa relação os endofíticos podem auxiliar para planta controle biológico de pragas invasoras, metabolitos tanto primários como secundário e com isso auxiliar para o crescimento vegetal (STROBEL et al., 2004; SANTOS & VARAVALLLO, 2011; POLLI et al., 2012).

Por exercerem várias funções dentro da planta, as bactérias endofitas traz diversos benefícios, como a estimulação que visa a manutenção no crescimento do vegetal. Além do que, por meio de patógenos de biocontroles ou com a indução do sistema imunológico da planta (MORALES-CEDEÑO et al., 2020).

Os endofíticos quando exposto a infecção, tendem a liberar substâncias para planta no qual reside, e com isso desempenhando inúmeros benefícios na colonização, interação e instauração endofíticas, pois esses metabólitos liberados têm como forma de desempenhar não só o papel de defesa e competição, porém podem ser para inúmeras interações específicas entre os endofitos (KHARWAR et al., 2020). Sendo cada vez mais usados como antimicrobianos ou biocontroles naturais os microrganismos endofíticos são exequíveis possibilidades natural para controles de diversos patógenos.

O corpo humano, assim como as plantas também é um conhecido habitat de uma microflora muito diversificada, composta de populações benéficas, populações prejudiciais à saúde e populações que vivem comensalmente, as quais exercem pouca ou muita influência sobre seu hospedeiro em condições normais. A respeito dos microrganismos patogênicos, a maior preocupação é o surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos disponíveis.

A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, que tem uma relevância muito grande de resistência, podendo se desenvolver com facilidade em condições ambientais hostis como: secos, com pH mínimo de 4.2, máximo de 9.3, com ótimo de 7,0-7,5 e, a temperatura mínima de 6°C e máxima de 48°C, com ótimo de 37°C. podem ainda suportar altas concentrações de cloreto de sódio de até 25%, com isso produzindo diversos fatores de patogenicidade para seus hospedeiros (MCCULLOCH E MAMIZUCA, 2015).

Foram avaliadas e isoladas 102 bactérias endofíticas oriundas das sementes de plantas de guaraná, sendo elas da região do Amazonas e no Nordeste da Bahia, que foram testadas como fins de controle biológico, frente a cepa fitopatogênica de *Colletotrichum gloeosporioides*, onde observou que a maioria dos isolados do guaraná obteve desempenho positivo (SILVA, 2016).

Uma das propostas viáveis para se ter controle e que seja menos agressivo do uso de produtos químicos é o controle biológico, que avalia uma alternativa mais sustentável para a problematização descrita. Por ser uma técnica abrangente e de fácil manuseio, vem ganhando cada vez mais adaptação no dia a dia em diversas culturas (TOLOZA et al., 2020). Efetuado diretamente pela ação de microrganismos antagônicos não patogênicos é uma alternativa que vem sendo investigada para uso em sistemas de cultivo em escala comercial, visando o controle de pragas e doenças com menor impacto ambiental e com menor risco para o homem, bem como a redução de custos em relação ao emprego de métodos químicos tradicionais (MORAES 1992).

Vários trabalhos também importantes e mais atuais vêm contribuindo com essa técnica, e com isso sendo avaliados de certa maneira, onde a presença de microrganismos dentro de tecidos vegetais de uma boa aparência e saúde, vem estabelecendo novas perspectivas para o estudo da interação que existe entre a planta e o seu respectivo microrganismo (EMBRAPA, 2022). Com os estudos desses microrganismos, passa a ser facilitador diversas aplicações como à produção de futuros fármacos, aplicações biotecnológicas e o desenvolvimento de tecnologias inovadoras sustentáveis para o planeta (SILVA et al., 2019).

Não há um consenso na literatura quanto ao assunto, e aparentemente cada espécie bacteriana necessita de nutrientes específicos da expressão atividade antagonista bacteriana. Portanto, a atividade antagonista é mais bem visualizada em meios de cultura ricos, mas a espécie bacteriana a ser estudada pode exibir requerimentos nutricionais específicos para expressar diferentes bacteriocinas ou substâncias tipo-bacteriocina.

Assim, sendo, procurou-se através deste estudo, isolar e identificar as bactérias endofíticas proveniente das folhas da samambaia de espécie *Pteridium aquilinum*(L.)Kuhn in Kersten (1879), como controle biológico, bem como, avaliar a sua atividade antimicrobiana e antagônica frente à cepa de *Streptococcus pyogenes*, como medidas de suporte no manejo integrado de doenças bacterianas. Fato esse que possibilita futuro estudos mais detalhado no ramo biotecnológico, para verificar o potencial

bactericida dessas bactérias. Muitos estudos sobre microrganismos endofíticos com capacidade antagonica sobre patógenos precisam ser realizados, dado a importância como forma de empregar o controle biológico.

Além disso, ressalta-se que o estudo poderá elucidar questões acerca do conhecimento e entendimento sobre a ecologia do patógeno e do antagonista, fatores que são premissas para o sucesso no emprego do controle biológico (OLIVEIRA 2011).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Local do experimento**

O experimento foi realizado no laboratório de Genética de Microrganismos e espectrofotometria de massas (LABGEMMA) no departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

### **Obtenção dos isolados de Bactérias endofíticas da Samambaia e *S. pyogenes*.**

Foram utilizados 4 microrganismos endofíticos da coleção do laboratório (LABGEMMA) e uma cepa bacterianas de padrões internacionais (ATCC– American Type Culture Colletion) de *S. pyogenes* (ATCC 49619), já purificadas por esgotamento de estrias cruzadas e conservadas em Glicerol a 10%. Os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar Muller Hinton. Posteriormente foram repicados e transferidos para tubos de ensaio para conservação de culturas puras.

### **Determinação da atividade Antagonista**

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados, foi realizada segundo a metodologia de ICHIKAWA e colaboradores (1971), conhecida como Teste de difusão em Ágar, onde foi preparado o meio Ágar Mueller Hinton (MHA), para a cepa de *S. pyogenes* e as bactérias endofíticas que foram cultivadas no meio de manutenção Muller Hinton (MHA) a 35 ° C por 24 horas. Após este período, a colônia da cepa patogênica foi isolada para tubo contendo 5 mL de água destilada até obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland (escala de turvação correspondente ao crescimento bacteriano em caldo). Na sequência foi inoculada com auxílio de swab em placas estéreis contendo meio de cultura MHA em toda área da placa de Petri. As bactérias endofíticas selecionadas para o teste foram previamente cultivadas em meio MHA, também por 24 horas. Após este tempo, foram feitos blocos que foram colocados sob a superfície paralela da placa contendo a *S. pyogenes*. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar com auxílio de bico de Bunsen e em seguida as placas foram incubadas à 37 ± 1 °C. na B.O.D. O experimento foi realizado em triplicata. Ao longo de 72 horas observou-se os halos formados e sua medição foi feita em milímetros com auxílio de um paquímetro e retirado a média dos halos.

### **Extração de DNA das bactérias endofíticas**

Os isolados bacterianos selecionados foram crescidos em meio TSB (HIMEDIA), e incubados por 2 dias a 28<sup>o</sup>C, sob agitação (150 rpm). A cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 g por 2 minutos, e ao precipitado obtido foram adicionados 500 µL de tampão de extração (TE – Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, ambos pH 8,0), 80 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)10% e 0,5 g de sílica (0,1 mm). Em seguida, a suspensão foi agitada em homogeneizador de Células (Ação Científica) por 1

minuto a 10.000 g, e em seguida, centrifugada por 10 minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado a ele 500 µL de fenol, sendo então a suspensão homogeneizada por inversão e centrifugada nas condições anteriores. O sobrenadante foi, então, transferido para outro tubo e adicionados 500 µL de clorofórmio. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada novamente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo com 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isopropílico (5:4:1), homogeneizado, centrifugado por 7 minutos a 10.000 g e coletado. Em seguida, foram adicionados 4 µL de NaCl (5 M) e 400 µL de isopropanol. A mistura foi deixada por 5 minutos à temperatura de -20°C e centrifugada por 10 minutos a 10.000 g. O DNA foi lavado com etanol 70%, seco a 40°C por 30 minutos e eluído em 50 µL de água deionizada esterilizada.

### **Identificação molecular dos isolados bacterianos reação em Cadeia da Polimerase – PCR**

realizou-se o procedimento de PCR colony, onde as bactérias foram cultivadas por esgotamento em estrias em meio de cultura TSB 25% (28 °C, 18-24 horas) até o surgimento de colônias isoladas e puras. Com auxílio de palito esterilizado, uma colônia foi coletada e transferida para microtubo de 1,5 ou 2,0 mL contendo 200 µL de água ultrapura esterilizada. O microtubo foi homogeneizado em vórtex por 5 min e em seguida incubado a 99 °C por 5 min. Uma alíquota de 1 µL desta suspensão foi utilizada como molde na reação de PCR.

### **Amplificação do gene 16S rDNA pela reação de PCR**

A amplificação da região 16S do DNA ribossômico de bactérias foi realizada com os oligonucleotídeos universais P027F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'), aproximadamente 1500 pb (LANE, 1991) em uma reação de 50 µL, contendo: tampão 1X (PROMEGA; Phoneutria) ; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (PROMEGA; Phoneutria); 0,2 mM de dNTPs; 0,2 µM de cada oligonucleotídeos; 1,5 U de Taq polimerase (PROMEGA; Phoneutria) e 1 µL do DNA genômico. A reação de amplificação ocorreu em termociclador (Applied Biosystems Veriti™) com a programação: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos, consistindo em desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 63 °C por 1 min e 30 seg e extensão de 72 °C por 1 min e 30 seg, finalizando com a extensão final a 72 °C por 10 min.

### **Purificação do DNA, sequenciamento e análise das sequências**

Os produtos de amplificação do DNA genômico de bactérias foram purificados utilizando Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA) de acordo com as especificações do fabricante. As sequências obtidas a partir do gene 16S rDNA foram utilizadas para identificação dos isolados nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://ncbi.nlm.nih.gov>), por meio do Blastn. Foram consideradas sequências com dissimilaridade menor ou igual a 3% com as do banco de dados.

### **Técnica de coloração de Gram**

As colônias foram submetidas a técnica de Gram tidas como coloração de Gram, para verificar a pureza da cultura, visando analisar sua reação à coloração, bem como sua micromorfologia. Através desse método que visa diferenciar as bactérias por sua coloração após tratamento com produtos químicos próprios. Criado pelo dinamarquês Hans Christian Joachim Gram sendo ele médico, em 1884. O método consiste em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor e com os reagentes, o processo. Para a coloração foi utilizada, uma gota de solução salina 0,85%, onde foi transferida para a superfície de uma lâmina de microscopia, no qual uma pequena quantidade de células bacterianas foi

reunida com auxílio de uma alça de platina. A lâmina foi colocada próxima a chama do Bico de Bunsen até o material fixar e seguidos os seguintes passos: confeccionou o esfregaço da amostra, corou com o violeta de cristal por 60 segundos, lavou com água destilada, cobriu com Lugol por 60 segundos e em seguida lavou com água destilada, a lâmina recebeu gotejamento de álcool-acetona (1:1) por cerca de 15 segundos, seguida da lavagem em água destilada, foi corada com fucsina de Ziehl, durante 1 minuto, lavada rapidamente com água destilada e secada à temperatura ambiente, com a lâmina disposta em posição vertical sobre papel toalha. As observações foram realizadas preferencialmente utilizando-se aumento de 1000X, para verificar se os micro-organismos são Gram-positivos, Gram-negativos.

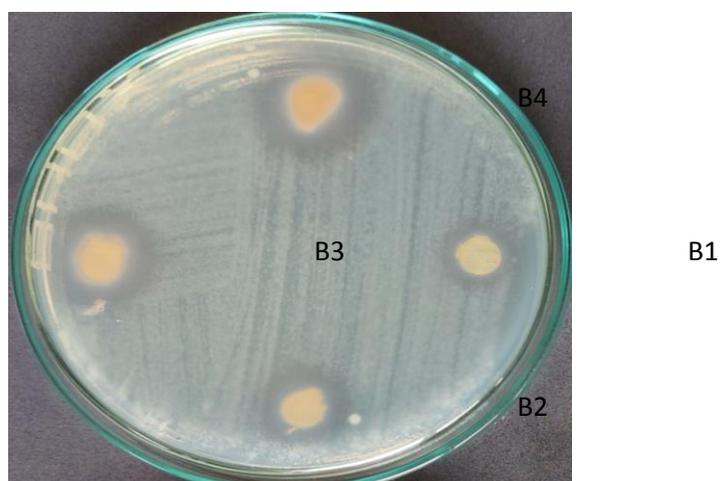
### **Análise Estatística**

Os experimentos foram feitos em três repetições, para a comparação de crescimento dos halos, e os dados foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 5% de significância. Para análise dos dados foi utilizado o programa com o software Sisvar, versão 5.6, segundo as recomendações de FERREIRA (2014). E feito a partir do Excel® as tabelas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Determinação da atividade Antagonista**

Dos dez isolados bacterianos endofíticos testados contra a cepa de *S. pyogenes*, quatro apresentaram atividade antagonista, conforme demonstrado na figura 1. Os resultados obtidos no teste Antagonista em 72 horas, demonstraram que a ação das linhagens B1, B2, B3 e B4 apresentaram atividade antimicrobiana contra a cepa patogênica de *S. pyogenes*.



**Figura 1.** Teste de antagonismo com resultado positivo para B1, B2, B3 e B4, frente a cepa patogênica de *S. pyogenes*.

As análises a partir do crescimento dos halos (tabela 2) em relação a bactéria patogênica *S. pyogenes*, observou-se que, apesar de desenvolver halos de inibição a partir dos isolados das bactérias endofíticas, as que mais se diferiu foram a B4 e a B3, obtendo-se 5,29 e 4,27mm de crescimento dos seus respectivos halos em relação a B2 e a B1, uma vez que, o atual estudo pode ser confrontado aos trabalhos de SARMENTO et al., (2016) onde foi analisado que algumas bactérias endofíticas sobre

algumas cepas patogênicas, entre eles a *C. albicans*, obtiveram resultados antagonistas, que variam entre 3.18 mm a 5.65 mm. Obtivemos um resultado promissor conferido ao dele, que testou várias bactérias. Uma vez que, esse trabalho apenas dez foram testadas, e demonstraram potencial antimicrobiano frente a cepa patogênica testada.

Conforme, HIGGINBOTHAM E MURPHY (2010) que avaliou através da atividade antimicrobiana de *Streptomyces* isolados de solo Cambojano mostraram que os isolados apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras.

GARCIA et al (2015), afirma que, as bactérias podem realizar respostas secundárias como antibiose, sendo assim desenvolvidas como antibióticos ou metabólitos que tem como função, matar, degradar e inibir o crescimento do microrganismo patogênico.

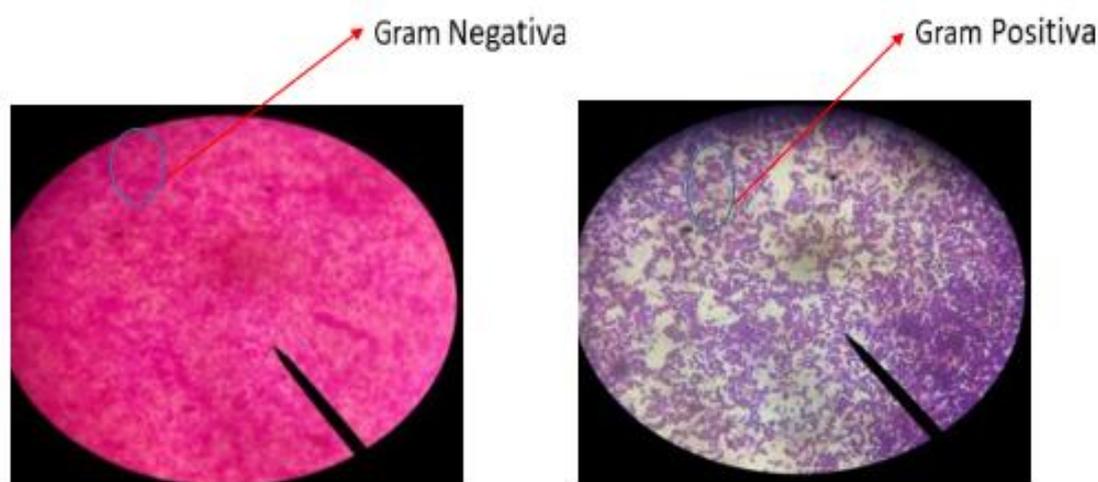
**Tabela 1.** Comparação entre as medidas dos halos de inibição em mm.

Teste de Antagonismo	
Bactérias endófitas	Halo (mm)
B1	1,57 b
B2	2,88 a
	4,27 c
B3	5,29 d
B4	
CV (%)	49,1

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey– 95% de significância.

### Identificação dos isolados bacterianos endófitos a partir da coloração de Gram

Considerando as características macroscópicas das colônias (figura 2) como, coloração e aspecto, a amostra analisada, procedimento de isolamento e condição, foram selecionado 10 isolados para o estudo da diversidade de bactérias endófitas associadas a samambaia, e em seguida foram realizados a coloração de Gram. Após o teste de coloração de Gram, definiu-se que seis são bactérias Gram-positivas e quatro Gram-negativas.



**Figura 2.** (A) bactéria Gram-negativa (B) bactéria Gram-positiva a partir de isolados bacterianoendofíticos da samambaia.

### Identificação molecular dos isolados bacterianos

Dentre os dez isolados endofíticos, quatro foram identificados, por sequenciamento do gene de DNA. O critério de seleção para o sequenciamento foi baseado a partir do teste de antagonismo, no qual se obteve resultado promissor para os isolados sendo eles B1, B2, B3 E B4, tentando assim abranger os diferentes aspectos fenotípicos apresentados pelas linhagens. As sequências obtidas do DNA foram comparadas com sequências do GenBank através do programa BLASTn (NCBI – www.ncbi.nih.gov). Na tabela 1 são apresentadas as linhagens e suas respectivas identificações de similaridade do DNA. A partir dos resultados do sequenciamento percebeu-se a presença de *Burkholderia* sp. como microrganismos endofíticos associados a samambaia. O estudo realizado por SCHIMIDT (2012) corrobora sobre a ocorrência de bactérias endofíticas na cultura do pinhão-mansão, onde foram identificados oito gêneros de bactérias endofíticas entre elas estão: *Acinetobacter*; *Bacillus*; *Burkholderia*; *Microbacterium*; *Pseudomonas*; *Salmonella*; *Staphylococcus* e *Serratia*, a partir de identificação do DNA.

**Tabela 1.** Identificação das sequências de isolados de bactérias endofíticas da samambaia por meio de DNA.

ISOLADOS	IDENTIFICAÇÃO
B1	99% <i>Burkholderia</i> sp (AB103080)
B2	99% <i>Burkholderia</i> sp (AB103080)
B3	99% <i>Burkholderia</i> sp (AB103080)
B4	99% <i>Burkholderia</i> sp (AB103080)

Isolados analisados e identificados através do banco de dados Genbank.

Conforme demonstra, CARRIM et al. (2016) onde avaliou as bactérias endofíticas isoladas de *Jacaranda decurrens* Cham. (carobinha-do-campo), pode-se analisar que a produção de atividade antimicrobiana foi positiva em relação as cepas indicadoras (*Rhodococcus equi*, *Micrococcus luteus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Corynebacterium glutamicum* e *Bacillus subtilis*).

Na pesquisa de GONÇALVES et al. (2019), foi analisado assim como nessa pesquisa, o potencial da bactéria *Burkholderia seminalis* linhagem, que foi isolada de raízes de cana-de-açúcar, teve como resultado, produção de metabólitos secundários naturais que foi capaz de inibir microrganismos patogênicos como: *F. oxysporum*, *C. paradoxa*, *Ceratocystis fimbriata* e *Colletotrichum* spp. *in vitro*.

SHARMA et al. (2001), identificou em seus estudos Espécies de *Bacillus* e uma variedade de gêneros tais como *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, têm se destacado na produção de lípases. Sendo assim, essas bactérias tem as principais aplicações que envolvem a produção de detergentes, produção de laticínios, processamento de óleos, biotransformações, produtos farmacêuticos, produção de agroquímicos, pesticidas e inseticidas.

O atual estudo pode ser confrontado aos trabalhos de SARMENTO et al. (2016) onde foi analisado que algumas bactérias lácteas sobre algumas cepas patogênicas, entre eles a *C. albicans*, obtiveram resultados antagonistas, que variam entre 3.18 mm a 5.65 mm. Obtivemos um resultado promissor conferido ao dele, que testou várias bactérias. Uma vez que, esse trabalho apenas quatro foram testadas, e demonstraram potencial antimicrobiano frente a cepa patogênica.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das dez bactérias endofíticas testadas ao teste de antagonismo, quatro obtiveram resultado significativo em relação as demais testadas, são elas B1, B2, B3 e B4. Observou-se que, apesar de desenvolver halos de inibição a partir dos isolados das bactérias endofíticas, as que mais se diferenciaram foram a B4 e a B3, obtendo-se 5,29 e 4,27mm de crescimento dos seus respectivos halos em relação a B2 e a B1 frente a *S. pyogenes*. A partir do teste de antagonismo foram separadas apenas as bactérias endofíticas que obtiveram resultado promissor em relação a cepa patogênica e em seguida identificadas, por sequenciamento do gene de DNA, sendo elas B1, B2, B3 e B4. A partir dos resultados do sequenciamento percebeu-se a presença de *Burkholderia* sp. como microrganismos endofíticos associados a samambaia. As dez bactérias ao passar pela coloração de Gram foram identificadas como seis bactérias Gram-positivas e quatro Gram-negativas. A investigação de ação antimicrobiana a partir de plantas ainda são pouco estudadas através do método de antagonismo, se faz uma ferramenta valiosa, para controle biológico contra microrganismos, perigosos e degradantes aos seres vivos. Sendo assim, estudos mais aprofundados são necessários para melhores resultados e validar seu potencial biotecnológico. Portanto, este trabalho tem como contribuição a compreensão das interações endofíticas de plantas e abrir novas perspectivas sobre o potencial biotecnológico dos microrganismos de plantas da Amazônia, praticamente inexplorada neste campo.

## Referências

- CARRIM, A. J. I. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias endofíticas isoladas de *Jacaranda decurrens* Cham. (carobinha-do-campo). **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23, p. 1374-1385, 2016.
- CAIRES N, C, M.; **Estudo in vitro das interações bacterianas de bactérias isoladas de infecções endodônticas e caracterização parcial de substância(s) antagonista(s) produzidas por amostra de *C.butyricum***. Dissertação de Mestrado. 2005.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Jornal do Endofítico, Embrapameio ambiente**. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/introducao.html>. Acesso em: 15/04/2022.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2. 2014.
- FREITAS, V, R.; PICOLI S, U; **A Coloração de Gram e as Variações na sua Execução**, Centro Universitário Feevale – Laboratório de Biomedicina, Ed. 82, Newslab, 2007.
- GONÇALVES, P.J.R.d., Hume, C.C., Ferreira, A.J. et al. Environmental interactions are regulated by temperature in *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3. **Sci Rep** **9**, 5486. 2019.
- GARCIA, T. V. et al. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, 2015.
- HIGGINBOTHAM, S. J.; MURPHY, C. D. Identification and characterization of a *Streptomyces* sp. Isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Research**, v. 165, p. 82-86, 2010.
- ICHIKAWA. T; ISHIKURA, T; OZAKI, A. A improvement of kasugamycin – Producing Strain by the Agar Piece Method and Prototroph Method. **Folia Microbiológica**, v.16, p. 218-224, 1971.

JAEGER, K. E.; SCHNEIDINGER, B.; ROSENAU, F.; WERNER, M.; LANG, D.; DIJAKSTRA, B. W.; SCHIMOSSEKE, K.; ZONTA, A.; REETZ, M. T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, The Netherlands, v.3, p. 3-12, 1997.

KHARWAR, R. N., SHARMA, V. K., MISHRA, A., KUMAR, J., SINGH, D. K., VERMA, S. K., & KUSARI, S. Harnessing the phytotherapeutic treasure troves of the ancient medicinal plant *Azadirachta indica* (Neem) and associated endophytic microorganisms. **Planta medica**. 2020.

KIMURA, O, **Importância das populações "residentes" de fitobactérias na epidemiologia de enfermidades bacterianas**. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.6, p.310-311, 1981.

MCCULLOCH, J. A., MAMIZUCA, E. M. *Staphylococcus aureus* In: *Microbiologia*. Trabulsi, L. R., Alterthum, F. 6. ed. São Paulo, **Atheneu**, pp. 179-188, 2015.

MORALES-CEDENO, L. R., DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M., LOEZA-LARA, P. D., PARRA-COTA, F. I., DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S., & SANTOYO, G. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: **Fundamentals, methods of application and future perspectives**. *Microbiological Research*, 126612. 2020.

MARCUZZO, L, L, **Importância das populações epifíticas na epidemiologia de enfermidades**; *Revista de Ciências Agrovetinárias*. Lages, v.8, n.2, p. 146-151, 2009.

MORAES, W, B, C, **Controle alternativo de fitopatógeno**, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.27, p. 175-190, 1992.

MARIANO, R, L, R, **Métodos de seleção "in vitro" para controle microbiológico**. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 1, p. 369–409, 1993.

OLIVEIRA C, T,; **Controle biológico: fungos endofíticos com potencial antagonista a antracnose da soja** (*glycine max* (l.) merr) - X Congresso de Ecologia do Brasil, 16 a 22 de Setembro, São Lourenço – MG. 2011.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural products**, 257-268.2004.

Santos, T. T., & Varavallo, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 199-212.2011.

Polli, A., Neves, A. F. D., Gallo, F., Gazarini, J., Rhoden, S. A., & Pamphile, J. A. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*. 2012.

SARMENTO, E.G.; MARTINS, A.D.O.; CESAR, D.E.; MARTINS, E.M.F.; CAMPOS, A.N.R. **Potencial Antagonista de Bactérias Lácticas Frente a Microrganismo Patogênicos Bucais**. XX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. FAURGS. Gramado/RS Out de 2016.

SILVA, J. M. et al. Antagonismo de *thielaviopsis paradoxa* e *fusarium oxysporum* por fungos rizosféricos associados à cactáceas do semiárido alagoano e eficiência de duas técnicas de avaliação. **Global Science and Technology**, v. 12, n. 1, 2019.

SILVA, M. C. S. et al. Endophytic cultivable bacterial community obtained from the Paulliniacupana seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against Colletotrichum gloeosporioides. **Microbial pathogenesis**, v. 98, p. 16-22, 2016.

SCHIMIDT, V. A. **Ocorrência de bactérias endofíticas na cultura do pinhão manso (Jatropha curcas L.)**. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 66, 2012.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 19, p. 627-662, 2001.

SOUZA, F, S, FEITOSA, L, O, F.; **Manual de orientação para elaboração de artigos científicos nos cursos de graduação e pós-graduação da Escola Superior Batista do Amazonas** – 2 ed. Revista e aumentada – Manaus: ESBAM. p. ilustr. 2012.

TOLOZA-MORENO, D.L. et al., Antagonist capacity of bacteria isolated from cape gooseberry cultures (Physalis peruviana L.) for biological control of Fusarium oxysporum. **Trop. plant pathol.** 45, 1–12.2020.

Recebido em: 06-10-2021

Aceito em: 18-05-2023

Endereço para correspondência:  
Nome Queila Sintia Neles da Silva  
email queilaneles@gmail.com



Esta obra está licenciada sob uma [Licença Creative Commons Attribution 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)