



UNIVERSIDADE CEUMA - UNICEUMA
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO DO MESTRADO EM BIOLOGIA MICROBIANA

ÉRIMA JÔYSSIELLY MENDONÇA CASTRO PEREIRA

**BIOPROSPECÇÃO MICROBIANA DE ÁREA DE MANGUEZAL PARA
UTILIZAÇÃO AGROPECUÁRIA**

SÃO LUÍS - MA

2021



ÉRIMA JÔYSSIELLY MENDONÇA CASTRO PEREIRA

**BIOPROSPECÇÃO MICROBIANA DE ÁREA DE MANGUEZAL PARA
UTILIZAÇÃO AGROPECUÁRIA**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana pela Universidade CEUMA.

Orientadora: Prof^ª.Dr^ª. Rita de Cássia Mendonça de Miranda

Coorientador: Dr. Luís Cláudio Nascimento Silva.

SÃO LUÍS -MA

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

Defesa da dissertação de mestrado de Érima Jôyssielly Mendonça Castro Pereira, intitulada: Bioprospecção Microbiana de Área de Manguezal Para Utilização Agropecuária, orientada pela Professora Dr^a. Rita de Cássia Mendonça de Miranda, apresentado à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade CEUMA, no dia 06 de agosto de 2021. Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Flávia Virginia Ferreira de Arruda
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (Membro externo)

Dr.^a Juliana Ribeiro Alves dos Santos
Universidade CEUMA (Membro interno)

Dr. Luís Cláudio Nascimento Silva
Universidade CEUMA (Mémoria)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Deus criador, dono de toda ciência, a minha família, em especial, meus pais Mariano Pinheiro Castro e Maria José Mendonça Castro que sempre foram meus maiores incentivadores e ao meu esposo Carlos Drielson da Silva Pereira, meu porto seguro e melhor amigo nessa jornada chamada vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, amor, misericórdia e graça a mim concedidos de forma incondicional. Por todas permissões e desafios encontrados no caminho, através dos quais tentei, errei, recomecei, cresci, acertei e amadureci. Pela saúde e fé que jamais me faltaram para enfrentar as adversidades e manter o foco, certa de que jamais estive sozinha.

Abaixo do Criador, agradeço a meu querido e estimado esposo por dividir suas conquistas e inspirar-me a ser melhor diariamente; por segurar minha mão, alegrar meus dias difíceis e lutar com bravura ao meu lado. Da mesma forma, agradeço aos meus amados e honrosos pais Mariano Pinheiro Castro e Maria José Mendonça Castro que nunca mediram esforços para investir em todas as áreas da minha vida, ainda que com algumas dificuldades, jamais deixaram de ser meus maiores incentivadores. Por terem acreditado mais uma vez em mim e estado ao meu lado todos os dias, sendo as pessoas com quem sempre posso contar: minha eterna gratidão à vocês que serão sempre meus maiores professores.

À minha preciosa e valente irmã Érica Jôysse Mendonça Rocha, que até nos dias mais corridos sempre estendeu sua mão para me ajudar, assim como sua admiração e todo seu cuidado, que certamente fazem de mim alguém especial: tenho a honra e privilégio de aprender com você. Estendo minha gratidão a toda família e amigos que apoiaram e acompanharam essa trajetória, em especial, Ana Victória Pereira Pinheiro e minha parceira de pesquisa Érika Amorim, que inúmeras vezes colaborou com meu trabalho.

Agradeço ainda, a todos os professores que contribuíram para minha jornada acadêmica até o presente momento. Em especial, prof. Dr. Paulo César Mendes Villis pelas oportunidades a mim concedidas no início de minha jornada científica: Suas contribuições me prepararam para chegar até aqui e jamais serão esquecidas. Grata aos prezados Sr. Hélio, Sr. Marinaldo e Sra. Lúcia, funcionários da universidade CEUMA que facilitam nosso trabalho.

Estendo meus agradecimentos, com carinho especial, à admirável Prof^a.Dr^a. Rita de Cássia Mendonça de Miranda que com suas orientações, lapidou-me com louvor, de tal maneira que jamais duvidou do meu sucesso desde o início de minha graduação, bem como do processo seletivo do mestrado, até minha defesa. Declaro abertamente que

minha orientadora, é a personificação da atuação profissional por mim um dia idealizada e, portanto, sinto-me orgulhosa, apadrinhada e satisfeita sob sua orientação:

serei eternamente grata por tamanho privilégio.

Por fim, agradeço a universidade CEUMA e a FAPEMA pela oportunidade e apoio financeiro conferidos para concretização desta pesquisa.

RESUMO

O manguezal é um ecossistema rico, que embora seja limitante para o crescimento microbiano devido a sua dinâmica de transição, contém microrganismos com habilidades de sobrevivência interessantes no contexto biotecnológico. Visando a de busca por compostos bioativos com potencial biopesticida, objetivou-se selecionar microrganismos isolados de sedimento carrapato bovino. As amostras de sedimento coletadas para isolamento microbiano foram caracterizadas quanto aos parâmetros físico-químicos abrangendo granulometria, teor de matéria orgânica, pH e umidade. Os sedimentos nos pontos amostrais apresentaram-se, em sua maioria, “Areia Fina à Média Siltosa à Argilosa”. Do isolamento microbiano obtiveram-se 19 isolados que foram observados macro e microscopicamente, e identificados por técnicas clássica e molecular, resultando em 17 bactérias e 2 fungos filamentosos. Foi realizada a extração de metabólito secundários por técnica líquido-líquido utilizando solvente Acetado de Etila para obtenção do analito desejado, com rendimento satisfatório. As atividades biológicas foram realizadas utilizando cinco fitopatógenos: *Fusarium solani* (Fp1), *Fusarium oxysporum* (Fp2), *Macrophomina phaseolina* (Fp3), *Rhizoctonia solani* (Fp4), e *Sclerotium rolfsii* (Fp5). O ensaio em meio sólido proporcionou a visualização de halos de inibição, que também foram observados no ensaio em meio líquido, no qual destacou-se a bactéria *Serratia marcescens* (B08). Dos 19 isolados, 9 tiveram bom desempenho em ambos os ensaios. Em seguida, realizou-se a investigação de quitinase e avaliação dos extratos frente a carrapato bovino. Nesta etapa, 4 isolados se apresentaram promissores como biopesticidas. Para se entender qual mecanismo de ação nas células dos patógenos, realizou-se a observação da alteração micromorfológica dos inóculos expostos aos líquidos metabólicos, que culminou na inibição da esporulação e germinação dos fitopatógenos. Para avaliar o grau de comprometimento que o metabólito causava ao inseto na fase larval, realizou-se também teste em modelo alternativo (*Tenebrio molitor*), utilizando-se relação teste-controle obtendo como resultado baixo comprometimento larval da maioria dos metabólitos secundários. Portanto, podemos inferir através desses resultados que o manguezal é um ambiente propício para isolamento de microrganismos com atividades biológicas que os tornam promissores para controle biológico.

Palavras-chave: Bioprospecção microbiana, Controle biológico, Metabólitos secundários, Manguezal, Fitopatógenos.

ABSTRACT

The mangrove is a rich ecosystem, which although it is limiting for microbial growth due to its dynamic transition, contains microorganisms with interesting survival abilities in the biotechnological context. In view of the need to search for bioactive compounds with biopesticidal potential, we aimed to select microorganisms isolated from mangrove sediment with activity against agricultural pathogens and bovine ticks. The sediment samples collected for microbial isolation were characterized as to physicochemical parameters including granulometry, organic matter content, pH and humidity. The sediments in the sample points were mostly "fine to medium silty to clayey sand". From the microbial isolation 19 isolates were obtained that were observed macro and microscopically, and identified by classical and molecular techniques, resulting in 17 bacteria and 2 filamentous fungi. The extraction of secondary metabolites was performed by liquid-liquid technique using ethyl acetate solvent to obtain the desired analyte, with satisfactory yield. The biological activities were performed using five phytopathogens: *Fusarium solani* (Fp1), *Fusarium oxysporum* (Fp2), *Macrophomina phaseolina* (Fp3), *Rhizoctonia solani* (Fp4), and *Sclerotium rolfsii* (Fp5). The assay in solid medium provided the visualization of inhibition halos, which were also observed in the liquid medium assay, in which *Serratia marcescens* (B08) stood out. Of the 19 isolates, 9 performed well in both assays. Next, chitinase was investigated and the extracts were evaluated against bovine ticks. In this step, 4 isolates showed promise as biopesticides. To understand the mechanism of action in pathogen cells, the micromorphological alteration of the inocula exposed to the metabolic liquids was observed, which culminated in the inhibition of sporulation and germination of the phytopathogens. To evaluate the degree of impairment that the metabolites caused to the insect in the larval stage, we also performed tests in an alternative model (*Tenebrio molitor*), using a test-control relationship, obtaining as a result low larval impairment of most of the secondary metabolites. Therefore, we can infer through these results that the mangrove is a suitable environment for the isolation of microorganisms with biological activities that make them promising for biological control.

Keywords: Microbial bioprospecting, Biological control, Secondary metabolites, Mangroves, Plant pathogens.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Porcentagem

° – Grau

° C – Grau Celsius

' – Minutos

" – Segundos

BDA – Agar Batata Dextrose

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

cm – Centímetros

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

g – Grama

G⁺ – Gram positivo

G⁻ – Gram negativo

h – Hora

KCl – Cloreto de Potássio

km – Quilômetro

MA – Maranhão

MH – Mueller Hinton

mL – Mililitro

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

P – Ponto

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotação por minuto

S – Sudeste

SAB – Saboraud

SO – Sudoeste

W – Oeste

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização da Praia do Mangue Seco no Município da Raposa-MA.....	10
Figura 2: Percentual de microrganismos isolados meios de cultura MH e SAB	17
Figura 3: Percentual de microrganismos isolados	18
Figura 4: Resultado do rendimento final após extração.....	19
Figura 5: Halos de inibição produzidos frente a fitopatógenos no ensaio em meio sólido.....	20
Figura 6: Esporos de <i>Rhizoctonia solani</i> antes e depois da exposição aos metabólitos.....	22
Figura 7: Resultado do teste de toxicidade dos metabólitos frente a modelo alternativo.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Coordenadas dos pontos de coleta.....	11
Tabela2: Características físico-químicas do sedimento coletado do manguezal.....	16
Tabela3: Identificação molecular dos microrganismos isolados.....	18
Tabela 4: Lista de fitopatógenos usados e respectivos código.....	29
Tabela 5: Halos de Inibição (mm) formados no Teste em Meio Sólido.....	20
Tabela 6: Tamanho dos halos de Inibição (mm) formados no Teste em Meio Líquido.....	21
Tabela 7: Seleção de microrganismos potencialmente produtores de quitinase.....	21
Tabela 8: Extratos microbianos frente as larvas do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	22
Tabela 9: Esporos germinados após 14h de contato com o líquido metabólico.....	23

Sumário

1. Introdução	13
2. Materiais e Métodos	15
2.1 Caracterização da Área de Coleta	15
2.2 Coleta e Caracterização físico-química do Sedimento de Manguezal.....	15
2.3 Isolamento e Identificação dos Microrganismos	16
2.4 Identificação molecular: Extração do DNA, Eletroforese e Sequenciamento	17
2.5 Extrações dos metabólitos secundários por técnica Líquido-Líquido	18
2.6 Atividades biológicas	18
2.6.1 Fungos Fitopatógenos.....	18
2.6.2 Atividade frente a fungos fitopatogênicos: Ensaio em Meio Sólido.....	19
2.6.3 Atividade frente a fungos fitopatogênicos: Ensaio em Meio Líquido	19
2.6.4 Investigação de quitinase e Avaliação frente a carrapato	19
2.6.5 Avaliação da Toxicidade em Modelo Alternativo	20
2.7 Observação da alteração da micromorfologia	21
2.8 Análise Estatística	21
3. Resultados	21
3.1 Caracterização do Sedimento de Manguezal	21
3.2 Isolamento e Identificação Clássica dos Microrganismos	23
3.3 Identificação molecular.....	25
3.4 Extrações dos metabólitos secundários por técnica Líquido-Líquido	25
3.5 Atividades biológicas	26
3.5.1 Atividade frente a fungos fitopatogênicos: Ensaio em Meio Sólido.....	26
3.5.2 Atividade frente a fungos fitopatogênicos: Ensaio em Meio Líquido	28
3.5.4 Investigação de quitinase e Avaliação frente a carrapato	28
3.5 Observação da alteração da micromorfologia	29
3.6 Avaliação da Toxicidade em Modelo alternativo.....	30
4. Discussão.....	32
5. Conclusão.....	34
REFERÊNCIAS	35

1. Introdução

A agropecuária é um dos setores que mais impactam sobre a economia, visto que, abrange vários recursos de interesse comercial. (JÚNIOR, 2017; JOLY et al., 2019). Dentre os desafios associados à sua produtividade está o controle de pragas que afetam as lavouras e criações de animais (JUNIOR et al., 2018; SALES, 2021).

Organismos fitopatogênicos e carrapatos são inimigos em potencial da produção, pois ambos afetam e reduzem não só em números, mas a qualidade dos insumos agrícolas e pecuários (GOUDA et al., 2016; SILVA, 2021). Alternativas para controle de pragas e redução de perdas se tornam cada vez mais relevantes, bem como o desenvolvimento de pesquisas que garantam resolução de problemáticas como essa (SIMONATO et al. 2014; ZAMOUN et al., 2017).

A natureza, é fonte e base para novas pesquisas e desenvolvimento de ferramentas sustentáveis e eficientes, visto que, é um recurso para descobertas de novos compostos biologicamente ativos, resultantes da diversidade química existente nos seres vivos, que por sua vez, asseguram a biodiversidade através das suas relações de interação com ambiente no qual estão inseridos (BUTLER et al., 2014; BROWN; WRIGHT, 2016;).

Os manguezais são característicos de regiões tropicais e subtropicais que compreendem uma área de transição entre os ambientes terrestre e marinho, sujeita ao regime de marés (BLOTTA et al., 2016; DIAS et al., 2017). São ecossistemas ricos, porém limitantes para o crescimento microbiano devido a sua dinâmica de transição, que os tornam ambientes promissores para bioprospecção de microrganismos, que como estratégia de adaptação desenvolvem habilidades de sobrevivência interessantes no contexto biotecnológico (ALMEIDA et al., 2014; PEREIRA; BARROS; DE HOLANDA, 2019).

Estima-se que existam aproximadamente 18,1 milhões de hectares de manguezal no mundo (SCHAEFFER-NOVELLI, 2018). No Brasil, encontra-se uma das maiores extensões contínua de mangue que se estende desde o Cabo Orange no Amapá, até a foz do rio Araranguá, em Santa Catarina (LOURENÇO, 2017; AZEVEDO, 2018; LIMA et al., 2019). Dessa extensão, os estados Maranhão, Pará e Amapá detém cerca de 50% da área de manguezais do país (ICMBIO, 2018; FRAGOSO, 2019).

No Maranhão, as florestas de mangue são encontradas desde o município de Carutapera, na costa ocidental do estado, estendendo-se da costa oriental até o município de Tutóia. Os manguezais ocupam toda a faixa de terra abrangida pela foz e margens de diversos rios, até o limite interno da influência de maré nas reentrâncias maranhenses (MOREIRA; BRITO; FILHO, 2015; VIEGAS et al.,

2019).

A biomassa microbiana encontrada em sedimentos de manguezal apresenta um grande potencial biotecnológico com alta aplicabilidade em áreas diversas, pois manifestam atividades antimicrobianas, antioxidante e outros princípios ativos com propriedades inibitórias frente a patógenos agrícolas e clínicos (BONUGLI-SANTOS et al., 2015; PAULA, 2019). As comunidades microbianas presentes no solo desempenham papel de grande importância no processo de ciclagem de nutrientes e na degradação de matéria orgânica (MASON et al., 2014; XU, 2015).

Transformações de biomoléculas e liberação de compostos fruto do metabolismo microbiano podem ocorrer oriundas a esses processos (MAIA, 2016; TOMLINSON, 2016). O interesse industrial pela diversidade bioquímica dos microrganismos é crescente e impulsionado pela produção de insumos de valor econômico através da bioprospecção que possibilita identificar, avaliar, bem como explorar sistematicamente a diversidade microbiana visando recursos genéticos para fins comerciais (ARUMUGAM et al., 2017; KIELISZEK et al., 2017).

De acordo com Nandhini et al. (2018), as substâncias produzidas pelos microrganismos possuem papel fundamental no sucesso de seu desenvolvimento e sua interação com o meio, podendo estar associadas ou não ao crescimento microbiano. São bases essenciais para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, pois muitas pesquisas atestam a capacidade dos microrganismos inibirem o crescimento de outros organismos através de substâncias bioativas produzidas (BONUGLI-SANTOS et al., 2015; SILVA, 2016; VILLARREAL-DELGADO et al., 2018).

Os metabólitos primários são indispensáveis para o desenvolvimento dos microrganismos, visto que, diz respeito a reações químicas indispensáveis para a vida da célula (NANDHINI et al., 2018). Por sua vez, os metabólitos secundários são compostos extracelulares secretados no meio de cultura ao longo o crescimento como habilidade de sobrevivência, não estando associados ao crescimento celular (DE ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015; KUMAR et al., 2018). Estes, são importantes fontes de compostos biologicamente ativos que podem ser utilizados como biocontroles (MORAIS et al., 2014).

Segundo Simonato et al. (2014) e Sales (2021), o controle biológico fundamenta-se na utilização de inimigos naturais para regular uma população de organismos (pragas). É uma alternativa sustentável que proporciona vantagens, benefícios econômicos aliados a preservação do meio ambiente que culminam na redução do uso de agroquímicos e seus efeitos prejudiciais a saúde e equilíbrio ambiental (JUNIOR et al., 2018; TOLOZA-MORENO; LIZARAZO-FORERO; URIBE-VÉLEZ, 2020).

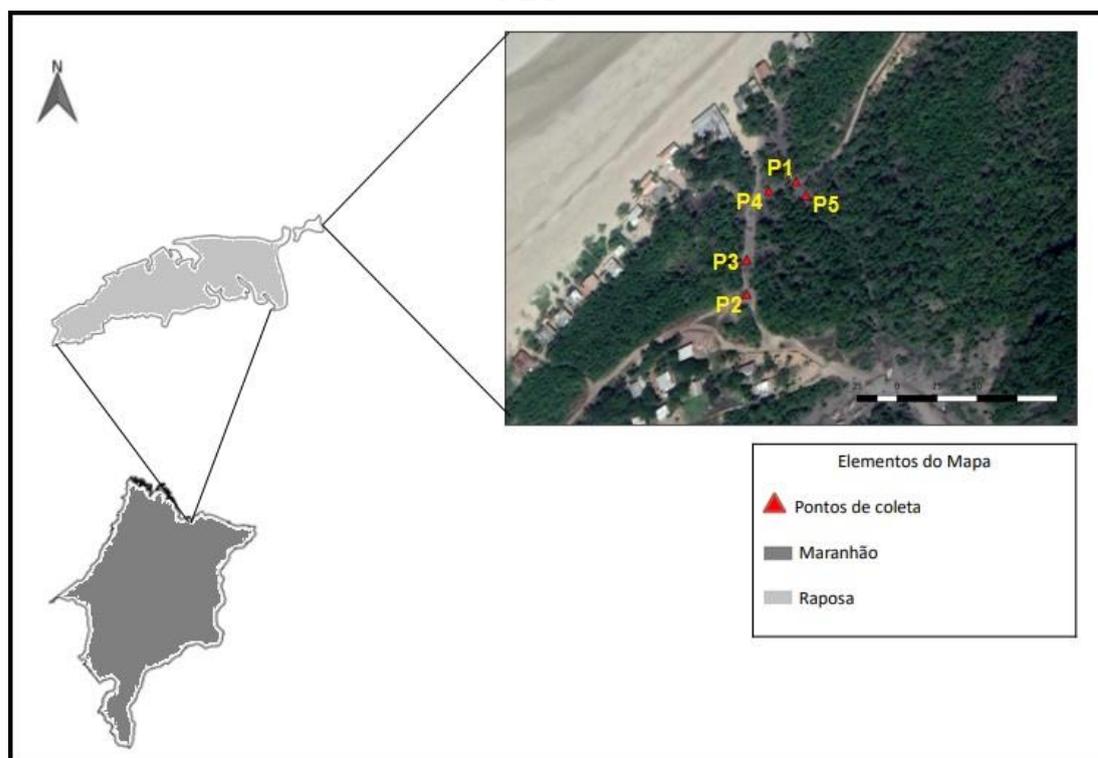
Tendo em vista a necessidade de busca por compostos bioativos provenientes de microrganismos capazes de inibir agentes patogênicos este trabalho objetiva a bioprospecção de microrganismos isolados de sedimento do Mangue Seco localizado no município de Raposa-MA, e avaliação dos isolados promissores quanto ao seu potencial biocontrolador de organismos fitopatogênicos na vertente agropecuária.

2. Materiais e Métodos

2.1 Caracterização da Área de Coleta

As amostras de sedimento utilizadas para este trabalho foram coletadas na área que compreende o Mangue Seco (Figura 1), localizado no município de Raposa – MA, estando este situado na mesorregião do norte maranhense a 30km da Capital São Luís, conforme as coordenadas 02° 25' 22" S 44° 06' 10" W.

Fig. 1. Localização da Praia do Mangue Seco no Município da Raposa – MA



Fonte: Google Earth Pro (2018)

2.2 Coleta e Caracterização físico-química do Sedimento de Manguezal

Tendo em vista a seleção de microrganismos interessantes no contexto biotecnológico, foram coletadas amostras de sedimento de maneira

sistemática em cinco pontos randomicamente selecionados e a uma profundidade de aproximadamente 20cm. A identificação dos pontos dada pela sigla “P” e por enumeração, em ordem crescente, de 1 à 5, são posteriormente seguida das respectivas coordenadas, conforme descrito na Tabela 1. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos hermeticamente fechados sendo, em seguida, encaminhadas para o Laboratório de Ciências do Ambiente (LACAM) da Universidade Ceuma para análise físico-química e isolamento dos microrganismos.

Tabela 1. Coordenadas dos pontos de coleta

Pontos	Coordenadas
P1	SO 2°= 27' 12.0" W= 044° 09' 34.0"
P2	SO 2°= 27' 10.0" W= 044° 09' 36.5"
P3	SO= 2° 27' 08.5" W= 44° 09' 36.5"
P4	SO= 2° 27' 07,7" W= 44° 09' 36.1"
P5	SO= 2° 27' 07.8" W= 44° 09' 35.4"

As propriedades físico-químicas do sedimento foram analisadas visando a associação destas com os microrganismos isolados. As análises físico-químicas abrangeram a determinação da granulometria, teor de matéria orgânica, pH e umidade baseada na metodologia recomendada por Alef (1995). A avaliação granulométrica foi realizada através do método de dispersão total fundamentado na velocidade de queda das partículas constituintes do solo. A matéria orgânica, por sua vez, deu-se por meio da oxidação via úmida com dicromato de potássio em meio sulfúrico, aproveitando-se o calor desprendido do ácido sulfúrico e/ou aquecimento como fonte de energia. Em seguida, após a oxidação, é titulado com solução padrão de sulfato ferroso amoniacal (sal de Mohr), o excesso de dicromato.

O potencial hidrogeniônico (pH) foi avaliado mediante medição do potencial com auxílio de eletrodo combinado imerso em suspensão solo: líquido (água, KCl ou CaCl₂) na proporção 1:2,5. Por fim, através da diferença de massa úmida e seca foi analisada a umidade presente no sedimento coletado, sendo todas as análises realizados em conformidade ao manual EMBRAPA, (2011).

2.3 Isolamento e Identificação dos Microrganismos

O isolamento dos microrganismos foi realizado de acordo com metodologia preconizada por Clark (1965), onde 10g de sedimento são incorporados a 90mL de água destilada esterilizada submetidos à agitação vigorosa por 30 minutos e, posteriormente, diluídos seriadamente de 1:10 até 10:1000. Então, um volume de 0,1mL das diluições 10:100 e 10:1000 foram inoculados em meios de cultura seletivos Muller Hinton Ágar (para isolamento bacteriano) e Sabouraud Ágar (para isolamento fúngico) pela técnica de espalhamento, incubando as placas em seguida, a $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por até 05 dias. Posteriormente ao crescimento das colônias, foram observadas as características macromorfológicas e realizada a purificação das colônias obtidas pela técnica de esgotamento e depois, repique destas para tubo de ensaio para armazenamento em geladeira a 4°C até a completa identificação.

Os microrganismos isolados foram identificados por análise macroscópica baseada na forma das bordas, brilho, textura, cor e tamanho, seguida da identificação micromorfológica por técnicas clássicas. Para observação dos aspectos micromorfológico dos fungos filamentosos foi utilizada a técnica de microcultivo para observação das estruturas vegetativas (hifas) e reprodutivas (esporos). As bactérias, por sua vez, foram identificadas quanto a morfologia, arranjo e coloração tintorial de parede celular, através da coloração de Gram para os principais grupos bacterianos conhecidos.

2.4 Identificação molecular: Extração do DNA, Eletroforese e Sequenciamento

As amostras recém crescidas dos microrganismos foram incubadas por 2 horas em 2mL de PBS a 27°C e, em seguida, centrifugadas a 7500rpm por 10 minutos, tendo seus sobrenadantes descartados após centrifugação. Em seguida, o pellet foi resuspendido em 180 μL de lizosina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{mililitro}$), e incubado por 30 minutos à 37°C . Após esse tempo foi adicionado 20 μL de proteinase K e mais 200 μL de solução tampão Buffer AL (fornecido pelo fabricante), homogeneizado e incubado novamente por 30 minutos à 56°C , e em seguida por mais 15 minutos à 95°C .

Após centrifugação do material foi adicionado 200 μL de etanol absoluto, homogeneizado e centrifugado novamente. As amostras foram transferidas para o Purification Kit (QIAmp DNA mini kit) e centrifugadas por 1 minuto à 8000rpm. Posteriormente, o filtrado foi descartado e foram adicionados 500 μL de solução tampão AW2 (QIAmp) e centrifugado por 3 minutos à 1400rpm. O filtrado foi descartado novamente e centrifugado por 1 minuto à 1400rpm, foi adicionado 50 μL de solução tampão Buffer AE (fornecido pelo fabricante) e incubado por 1 minuto e centrifugado

novamente por 1 minuto a 8000rpm. Essa última etapa foi feita com uma repetição. Após esse processo, o DNA foi quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000UV-Vis) e congelado à -20°C.

Com o auxílio de uma micropipeta, as amostras foram aplicadas nos poços do gel de agarose imerso em solução tampão TBE e a eletroforese ocorreu por 40 minutos. Em seguida, o gel foi corado com solução para coloração de ácido nucleico (0,1 µL/ml) da iniSafeDye (20.000X) por 40 minutos protegido da luz para observação em transiluminador de luz ultravioleta.

O produto de PCR foi sequenciado e analisado através do MegaSoftware® e Blast (NCBI). A sequência do gene 16SrRNA obtida pelo PCR foi analisada e alinhada manualmente com linhagens do gênero encontradas no banco de dados GenBank / NCBI com Clustral-X. A árvore filogenética foi construída usando MEGA versão 7.0. A sequência foi submetida ao GENBANK/PUBMED e depositada sob o código MT634691.

2.5 *Extrações dos metabólitos secundários por técnica Líquido-Líquido*

Para extrair os metabólitos de interesse do mosto fermentado foi utilizado o método de extração Líquido-Líquido conforme preconizado por Trisuwan et al. (2008). Objetivando a produção e secreção dos metabólitos, os microrganismos testados foram cultivados em meio líquido durante 72h. Após este período, o mosto obtido foi filtrado a vácuo e então separado o líquido metabólico, livre de células microbianas, que posteriormente foi submetido à centrifugação e filtrado novamente em filtro de 22µm, visando assegurar a ausência de células microbianas no extrato.

Visando a extração dos metabólitos secundários, foram adicionados 25mL do extrato e 25mL de Acetato de Etila em um funil de decantação, agitados vigorosamente e postos em repouso por 30 minutos. Em seguida, foi separada a solução bifásica formada, na qual a fase contendo o Acetato de Etila abrangeu o analito desejado e fora submetido a etapa de evapotranspiração, na qual a solução volátil de Acetato de Etila foi evaporada da vidraria permanecendo somente os metabólitos secundários isolados. Este material foi então pesado e calculado o rendimento dado por diferença de massa.

2.6 *Atividades biológicas*

2.6.1 *Fungos Fitopatógenos*

Os fungos fitopatógenos utilizados neste trabalho foram obtidos da coleção de cultura de Fitopatógenos da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) e cultivados meio Batata Dextrose Ágar (BDA), sendo das espécies

Fusarium solani (Fp1), *Fusarium oxysporum* (Fp2), *Macrophomina phaseolina* (Fp3), *Rhizoctonia solani* (Fp4), e *Sclerotium rolfsii* (Fp5).

2.6.2 Atividade frente a fungos fitopatogênicos: Ensaio em Meio Sólido

Os ensaios em meio sólido foram realizados através do teste de atividade antimicrobiana, como preconizado por Ichikawa et al. (1971) fundamentado na difusão do composto bioativo em ágar, conhecida também como Método do Bloco de Gelose. Os microrganismos isolados foram inicialmente cultivados em meio de cultura Ágar Sabouraud (SAB) e Ágar Mueller Hinton (MH) em placa de Petri. Após 5 dias de incubação a $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, blocos de ágar circulares de aproximadamente 6mm de diâmetro foram postos em placas contendo Ágar Dextrose Batata (BDA), previamente inoculadas com os patógenos agrícolas citados anteriormente.

O teste foi realizado em triplicata para todas os isolados. As placas foram incubadas respeitando-se as características fisiológicas de cada microrganismo. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição de cada bloco foram medidos (em milímetros), sendo efetuada uma média aritmética e desvio padrão dos resultados, utilizando-se a escala sugerida por Matsura (2004) para a classificação dos resultados.

2.6.3 Atividade frente a fungos fitopatogênicos: Ensaio em Meio Líquido

O teste de difusão em ágar preconizado por Bauer et al. (1966) foi realizado objetivando selecionar os microrganismos capazes de secretar os metabólitos produzidos para o meio externo. O teste foi estabelecido como padrão pelo CLSI (2011) - Clinical and Laboratory Standards Institute que consiste na aplicação de 50 μL do mosto fermentado em poços de aproximadamente 6mm de diâmetro contidos em placa de petri previamente semeado com os fitopatógenos, posteriormente incubadas a $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por até 72h. Ao fim deste período os halos de inibição foram observados e medidos com o auxílio de um paquímetro.

2.6.4 Investigação de quitinase e Avaliação frente a carrapato

Para investigação de quitinase foi realizada segundo a metodologia proposta por Kolla et al., (2009) adaptada. Uma suspensão com as culturas de cada linhagem foi inoculada em meio de Quitina-Extrato de levedura-Sais (CYS) contendo (g.L-1): quitina 5,0; extrato de levedura 0,5; fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2,0; sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1,0; e sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,1; ágar 10 e pH 7,0. Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meio Quitina-extrato de levedura-Sais e incubados a $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24h para observação de halo translúcido

ao redor da colônia quando o microrganismo fosse capaz de degradar a quitina, ao usá-la como substrato.

A avaliação dos extratos microbianos frente a carrapato foi realizada com larvas de carrapato bovino. O teste foi realizado no Laboratório de Controle de Parasitos (LPC) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), apenas com os microrganismos promissores no teste anterior, isto é, com aqueles capazes de degradar a quitina, pois dessa é constituído o exoesqueleto do inseto. A ação dos extratos microbianos sobre larvas de carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, (carrapato bovino), foi avaliada através do Teste de Imersão Larval (LIT) conforme o bioensaio preconizado por Klafke et al., (2006).

Os extratos microbianos foram diluídos em uma solução contendo 1,0% (v/v) de Dimetilsulfóxido P.A.(DMSO) e 0,02% (v/v) de Triton X-100. A concentração de extrato microbiano testada foram 1mg.mL⁻¹. O grupo controle foi tratado com solução de Triton X-100 a 1,0% (v/v) DMSO + 0,02% (v/v). Aproximadamente 500 larvas foram imersas por 10 min com inversão constante a 25 ° C em cada solução teste e então, foram transferidas para um filtro de papel para secagem. Em seguida, cerca de 100 larvas foram transferidas para um papel de filtro limpo e seco (8,5 × 7,5 cm) que foi dobrado e fechado com cliques. Os pacotes foram incubados a 27 ± 1°C com umidade relativa (UR) ≥ 80% por 24 h. Após a incubação, as larvas vivas e mortas foram contadas. As larvas que não se movem foram registradas como mortas. O experimento foi realizado em triplicata para cada tratamento.

2.6.5 Avaliação da Toxicidade em Modelo Alternativo

Para avaliar o grau de comprometimento que os metabólitos poderiam causar ao inseto na fase larval foi realizada avaliação da toxicidade dos líquidos metabólicos obtidos, a partir de uma relação teste-controle, foram utilizadas 10 larvas do inseto *Tenebrio molitor* para cada líquido metabólico obtido após o Ensaio em Meio Líquido. Placas de Petri foram previamente identificadas com as informações das amostras, sendo uma para cada amostra e grupo controlado por PBS (phosphate buffered saline) tampão fosfato-salino injetado, que contém uma solução salina compatível a do corpo humano.

As larvas foram separadas e submetidas a assepsia, priorizando o mesmo tamanho, peso e estágio. Em seguida, foram colocadas 10 larvas em cada placa, postas sobre gelo para que as larvas ficassem em estágio de hibernação e facilitando a manipulação destas. Com auxílio de seringas e agulhas descartáveis, 10µL das amostras de líquidos metabólicos insentos de célula foram injetadas no terceiro anel das larvas inoculando em grupos de

10 larvas por placa de petri. Posteriormente, as placas contendo larvas foram armazenadas em temperatura ambiente sendo observadas a cada 24h por 10 dias.

2.7 *Observação da alteração da micromorfologia*

Para observação alteração micromorfológica, conforme Diniz (2017), 1mL das suspensões de 10^7 conídios/mL foi adicionado a 9mL de cada concentração dos metabólitos e ainda, em água destilada estéril que compreende o grupo controle por cerca de 3 horas. Posteriormente, 50 μ l das suspensões de conídios foram semeados em meio BDA que foi incubada por 14 horas para contagem microscópica óptica do número de conídios germinados e não germinados.

Em seguida, após 8 dias de crescimento a $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, discos de aproximadamente $0,12\text{cm}^2$ foram postos em placas de Petri com BDA para o grupo controle e BDA acrescido de suas respectivas concentrações de cada metabólito. Então, foi determinada a esporulação transferindo 3 blocos de cerca de $0,28\text{cm}^2$ das colônias para tubos de ensaio com 5mL de Tween 80 (0,01%) para contagem dos esporos em câmara de Neubauer.

2.8 *Análise Estatística*

Os resultados foram analisados quanto às diferenças significativas e pelo teste de Log Rank, por meio da análise de variância (ANOVA). O nível de correlação existente entre os parâmetros testados foi avaliado de acordo com o Índice de Correlação de Spearman. O nível de significância de 95% foi considerado para que as medidas sejam significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Caracterização do Sedimento de Manguezal

Analisadas as principais características físicas-químicas dos sedimentos amostrais coletados, observa-se que a classificação dos sedimentos nos pontos P1, P3, P4 e P5 foram de areia fina à média siltosa à argilosa, enquanto o ponto P2 foi de areia fina à média argilosa à siltosa.

O teor de matéria orgânica demonstra variação nos diferentes pontos e, ao manifestar um percentual mais alto (61.23%) no P4, pode-se inferir que é devido ao fato deste ponto ser o mais próximo de raízes da vegetação predominante no ecossistema manguezal. Apesar da variação, o percentual de matéria orgânica encontrado no sedimento, maior que 20%, é um

indicativo de atividade microbiana.

Os valores para o pH também apresentam variação de acordo com os pontos coletados, estando P1 e P2 em torno da neutralidade, enquanto P3, P4 e P5 já se apresentam alcalinos. Os valores de pH nos pontos 1 e 2 favorecem um maior crescimento de microrganismos heterotróficos, visto que estes preferem um pH em torno da neutralidade. Do mesmo modo, o teor de umidade do sedimento varia muito entre os pontos, evidenciando que no P4 (onde foi observado um maior teor de matéria orgânica), a umidade apresentou-se baixa devido a esse ponto está longe da zona de saturação de água e pela coleta ter sido realizada no período de maré seca, justificando redução da umidade nesta parte. Além disso, o fato do sedimento no P4 ter se caracterizado como areia fina à média siltosa à argilosa favorece a percolação da água. Portanto, a presença de água no sedimento favorece o crescimento microbiano, uma vez que, suas atividades metabólicas são mediadas por enzimas hidrolíticas.

Tabela 2. Características Físico-Químicas do Sedimento coletado do Manguezal

Pontos	Argila	Silte	Areia Fina	M. Orgânica	Umidade	pH
P1	8,32% ^a	21,08% ^d	69,88% ^g	24,62% ^d	26,6% ^d	7,52 ^a
P2	11,72% ^b	10,74% ^b	77,54% ^h	11,25% ^b	2,10% ^j	7,09 ^a
P3	8,46% ^a	16,78% ^e	74,76% ^h	30,01% ^f	35,92% ^f	7,92 ^a
P4	10,14% ^b	32,09% ^f	78,61% ^h	61,23% ⁱ	5,33% ^j	8,02 ^a
P5	5,14% ^c	19,49% ^e	62,77% ⁱ	22,52% ^d	38,13% ^k	8,27 ^a

A análise estatística das características físico-químicas das amostras de solo coletadas foi realizada entre os pontos objetivando a observação de uma diferença significativa entre eles quanto a sua composição, levando em consideração um grau de confiabilidade de 95%. Após avaliação estatística pode-se concluir que o P2 é o único que não encontra diferença estatística significativa entre os componentes do solo. Todos os demais pontos têm uma quantidade de tipos de solo estatisticamente diferentes em sua composição.

Quando analisada a matéria orgânica, os pontos de coleta 1 e 5 não apresentaram diferença estatística significativa, enquanto todos os outros pontos de coleta mostraram-se estatisticamente distintos. Quanto a umidade, os pontos 2 e 4 não mostraram diferença estatística significativa entre si, enquanto todos os outros foram estatisticamente significativos. Dentre os parâmetros analisados, o pH foi o único que não houve diferença estatística

significativa em nenhum dos pontos de coleta.

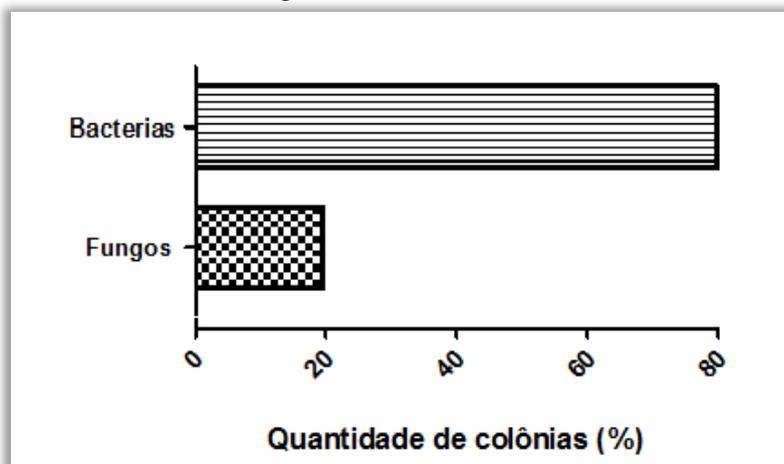
Quando realizada a análise de Spearman observa-se uma relação positiva com diferença estatística significativa entre as texturas argila e areia fina com $p=0.0240$. Entre todos os outros parâmetros avaliados não é observada correlação.

3.2 Isolamento e Identificação Clássica dos Microrganismos

A partir do isolamento de sedimento de manguezal foram obtidos 19 microrganismos viáveis para cultivo em laboratório, sendo destes, 80% foram bactérias (MH) e 20%, fungos filamentosos (SAB), conforme a Figura 2. Na observação macromorfológica, as colônias cultivadas no meio Mueller Hinton apresentaram aspecto leitoso em sua maioria, com forma arredondada, bordas por vezes regulares e outras irregulares caracterizando colônia típica do gênero *Bacillus*. A coloração observada no cultivo bacteriano apresentou uma variação abrangendo colônias amareladas, rosadas e esbraquiçadas.

Em contrapartida, nas colônias crescidas no meio de cultivo Sabouraud Ágar observou-se o crescimento de micélio aéreo e vegetativo espalhados na superfície da placa caracterizando colônias de fungos filamentosos. Em umas das placas observou-se uma colônia esponjosa de bordas irregulares, com aspecto acinzentado e, em outra, foi notada a presença de colônia com micélio cotonoso e regular, com bordas regulares e predominância em toda a placa, além de micélio aéreo com coloração castanho bege esverdeada. Para observar existência de diferença estatística significativa entre os grupos microbianos foi realizada análise estatística e constatou-se diferença significativa no isolamento dos dois grupos microbianos evidenciados com $p=0.0022$.

Figura 2. Percentual de microrganismos isolados meios de cultura MH e SAB.



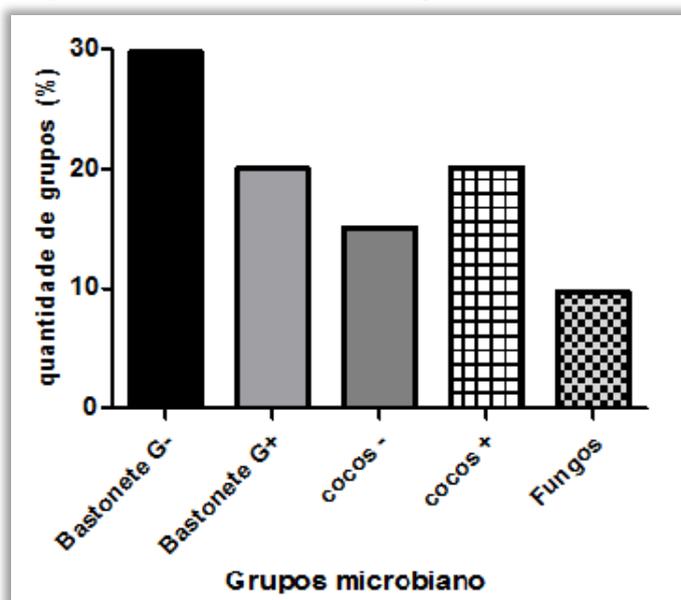
Posteriormente a descrição macromorfológica, com as colônias isoladas, foi realizada a observação micromorfológica dos microrganismos através da qual foi feita a observação do arranjo, forma das bactérias e a divisão de dois grandes grupos bacterianos (Gram positivas e Gram negativas). Após a observação micromorfológica, o percentual de microrganismos isolados demonstrou uma predominância de bactérias G^- , sendo a maioria bastonetes G^- , seguidos pelos bastonetes e cocos G^+ , finalizando com as bactérias com formato de cocos G^- , como demonstrato na Figura 3.

Dentre as bactérias G^+ observou-se um arranjo em cacho de uva com forma de coco, caracterizando o gênero *Staphylococcus*. A predominância de bactérias Gram negativas pode ser justificada pela sua morfologia de parede celular quimicamente mais complexa, dispendo no periplasma, grande quantidade de enzimas hidrolíticas que facilitam a nutrição bacteriana. As bactérias em formato de esferas têm uma maior capacidade de formar arranjos, sendo esta, uma estratégia de sobrevivência em ambientes de transição como o manguezal.

Os fungos filamentosos também se manifestaram no isolamento e sua adaptação ao ambiente do ecossistema manguezal é explicada pela sua capacidade natural de formar estruturas de resistência que auxilia esses microrganismos a se adaptarem a ambientes inóspitos.

A observação dos fungos filamentosos foi feita partir das características microscópicas obtidas após o preparo de cultivo em lâminas que possibilitaram a visualização de micélio imerso e ramificado, com hifas septadas hialina. Outra estrutura observada, foram esclerócios por vezes presentes. Em outra colônia fúngica, foram observados um micélio cotonoso esbranquiçado a castanho com hifas septadas e em suas extremidades, conídios.

Após a análise macro e microscópica dos isolados, foram estabelecidos os códigos segundo as identificações onde obteve-se, dentre as bactérias: 04 cocos G^+ , 03 cocos G^- , 04 bastonetes G^+ , 06 bastonetes G^- e 02 fungos filamentosos.

Figura 3. Percentual de Microrganismos isolados.

3.3 Identificação molecular

A identificação molecular dos microrganismos demonstrou uma similaridade genética acima de 95% para cada linhagem geneticamente compatível, conforme descrito na Tabela 3. Foi realizada, posteriormente, a confirmação da identificação macroscópica do gênero do isolado. A análise evolutiva foi realizada em MEGA X. Prosseguiram para identificação apenas os isolados promissores nos testes frente aos organismos fitopatogênicos. Portanto, do total de 19 microrganismos, apenas 10 seguiram para identificação, dos quais 3 ainda não foram identificados.

Tabela 3. Identificação molecular dos microrganismos isolados

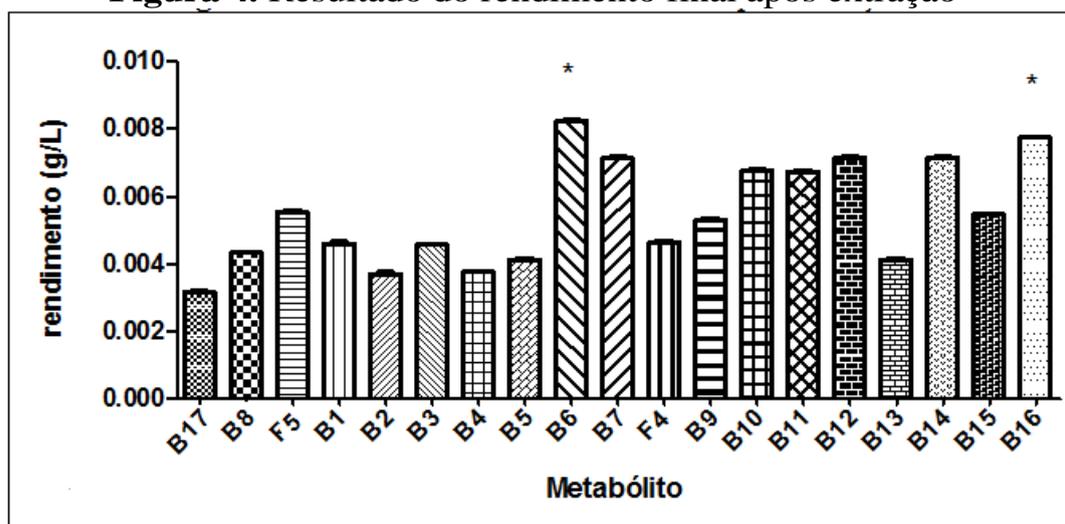
Código	Grupo Microbiano	Gram	Similaridade	Identificação
B1	Bactéria	G ⁻	99,20%	<i>Achromobacterkylooxidans</i>
B3	Bactéria	G ⁻	95,84%	<i>Pseudomonas protegens</i>
B6	Bactéria	G ⁺	97,83%	<i>Micrococcus yunnanensis</i>
B8	Bactéria	G ⁻	99,3%	<i>Serratiamarcescens</i>
B11	Bactéria	G ⁺	99,5%	<i>Bacillus humi</i>
B13	Bactéria	-	-	Nãoidentificado
B14	Bactéria	G ⁺	-	<i>Bacillus sp.</i>
B16	Bactéria	-	-	Nãoidentificado
F4	Fungo	-	99%	<i>Colletotrichum siamense</i>
F5	Fungo	-	98,01%	<i>Diaporthe sp.</i>

3.4 Extrações dos metabólitos secundários por técnica Líquido-Líquido

Com o intuito de quantificar o metabólito extraído do meio líquido através da técnica de separação Líquido-Líquido, analisou-se as frações em

miligramas do rendimento final da substância bioativa extraída, nos levando a inferir que a obtenção de uma quantidade desejável de metabólitos é viável através de técnica simples e barata, visto que, as amostras promissoras apresentaram rendimento final respectivo de 4,7mg (F4); 5,8mg(F5); 8,2mg (B6);4,3mg (B8); 5,6mg (B11); 4,1mg (B13); 7,1mg (B14); 5,5mg (B15) e 7,7mg (B16), conforme a Figura 4. Quando realizada uma comparação entre os rendimentos obtidos dos diferentes microrganismos, observa-se uma diferença estatística significativa dos metabólitos produzido pela bactéria B6 e B16 (Não identificado) em relação aos demais. Destaca-se que a bactéria B6 (*Micrococcus yunnanensis*) é um coco G⁺ que apresentou halos de inibição consideráveis nos ensaios em meio sólido e líquido.

Figura 4. Resultado do rendimento final após extração



3.5 Atividades biológicas

3.5.1 Atividade frente a fungos fitopatogênicos: Ensaio em Meio Sólido

O teste em meio sólido foi realizado frente aos fungos fitopatogênicos listados na Tabela 4 e o resultado do ensaio em meio sólido após medição dos halos pode ser visualizado na Tabela 5.

Tabela 4. Lista de fitopatogênicos usados e respectivos códigos

Código	Fitopatogêno	Fitopatologia
FP1	<i>Fusarium solani</i>	podridão radicular seca
FP2	<i>Fusarium oxysporum</i>	murcha de <i>fusarium</i>
FP3	<i>Macrophomina phaseolina</i>	podridão cinzenta da haste
FP4	<i>Rhizoctonia solani</i>	podridão radicular
FP5	<i>Sclerotium rolfsii</i>	murcha de esclerócio

Ao analisar os resultados perante a metodologia descrita, foi observada a formação de halos de inibição frente aos patógenos agrícolas como mostrado na Figura 5, onde podemos notar a ausência e presença de halos (A e B, respectivamente).

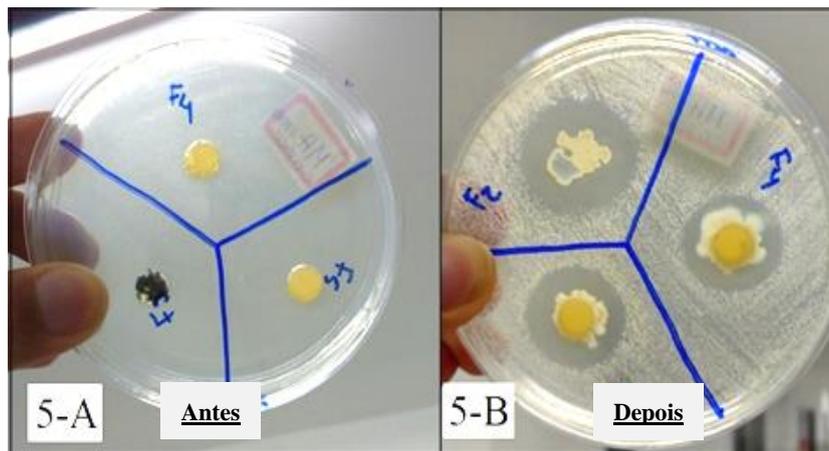
Tabela 5. Halos de Inibição (mm) formados no Teste em Meio Sólido

Código	FP1	FP2	FP3	FP4	FP5
B06	19,3±1,1	24±1,7	30,6±4,9**	34±1,0	37,6±0,5**
B08	22,6±2,0	32,6±1,1**	32,6±2,0**	35±1,0**	24±1,0
B11	11,6±2,8	34,6±0,5**	24,3±1,1	30,3±0,5	13,3±2,8
B13	33,3±2,8**	36,6±2,8	28,6±1,1	32,3±2,5**	26±1,7
B14	29±1,0	22±1,7	13,3±2,8	18,3±2,8	20,3±0,5
B15	21±1,0	17,3±2,5	13,3±2,8	20,3±0,5	15,3±0,5
B16	20,3±0,5	17,3±3,2	-	16,3±1,1	-
B17	-	21±1,0	17,6±2,5	-	29,3±1,1
F4	-	20,6±1,1	-	27,6±2,5	-
F5	25±1,0	-	-	31,6±2,8**	-

**p<0.01

As bactérias B08 (*Serratia marcescens*) e B13 (não identificada) mostraram-se mais promissoras dentre os microrganismos isolados, sendo capazes de inibir todos fitopatógenos com os maiores halos. Dentre os fungos filamentosos, o mais promissor foi o F4 (*Colletotrichum siamense*) frente a *Rhizoctonia solani* com halo de 35mm.

Figura 5. Halos de inibição produzidos frente a fitopatógenos no ensaio em meio sólido



3.5.2 Atividade frente a fungos fitopatogênicos: Ensaio em Meio Líquido

Com os microrganismos que apresentaram atividade no teste anterior, foi realizado o ensaio em meio líquido objetivando avaliar a capacidade de secreção dos metabólitos de interesse para o meio. Na Figura 6 podemos visualizar as respostas das atividades obtidas nessa etapa a partir da formação dos halos de inibição perante os patógenos agrícolas.

Analisando os resultados, nota-se uma diminuição do número de halos de inibição formados atestando que nem todos isolados são capazes de secretar para o meio externo os metabólitos secundários que produzem, afunilando para 9 a quantidade de microrganismos promissores (B6, B8, B13, B11, B14, B15, B16, F4 e F5). Nesse ensaio, destacaram-se as bactérias B6 (*Micrococcus yunnanensis*), B8 (*Serratia marcescens*) e B13 (não identificado), capazes de secretar os metabólitos que inibiram a maioria dos fungos fitopatogênicos.

Tabela 6. Tamanho dos halos de Inibição (mm) formados no Teste em Meio Líquido

Código	FP1	FP2	FP3	FP4	FP5
B06	-	21,3±1,1	23,3±2,8	27,6±2,5	-
B08	-	22,3±2,5	25,3±0,5	27,6±0,5	-
B11	-	21,3±1,1	-	-	-
B13	31±6,9**	29,3±1,1**	24,6±0,5	19,3±1,1	23,3±1,5
B14	26±1,0	20,3±0,5	-	17,3±2,5	-
B15	-	-	-	13±1,7	-
B16	-	-	-	13,6±1,5	-
F4	-	-	-	22,6±2,0	-
F5	18,3±1,5	-	-	22,3±2,5	-

**p<0.01

3.5.4 Investigação de quitinase e Avaliação frente a carrapato

Para selecionar os isolados com potencial carrapaticida, todos os 19 microrganismos foram testados quanto a sua capacidade de produzir quitinase. Destes, apenas dez apresentaram a produção dessa enzima. Portanto, os microrganismos B1, B3, B6, B8, B11, B13, B14, B16, F4 e F5 que se mostraram promissores foram testados quanto ao seu potencial como agente biocontrolador de carrapatos bovinos, já que têm a quitina como um dos principais constituintes do seu exoesqueleto.

Tabela 7. Seleção de microrganismos isolados de manguezal potencialmente

produtores de quitinase					
Código	Quitinase	Código	Quitinase	Código	Quitinase
B1	+	B8	+	B15	-
B2	-	B9	-	B16	+
B3	+	B10	-	B17	-
B4	-	B11	+	F4	+
B5	-	B12	-	F5	+
B6	+	B13	+		
B7	-	B14	+		

*(+) resultado positivo: presença do halo; (-) resultado negativo: ausência de halo.

A avaliação frente a inseto foi realizada com os dez isolados promissores no teste de investivação de quitinase e é apresentada na Tabela 8, onde quatro dos dez extratos microbianos testados mostraram-se efetivos sobre as larvas de carrapato.

Tabela 8. Extratos microbianos frente as larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus*

Código	Solvente (DMSO%)	Vol. Solvente (mL)	Concentração produto (g/mL)	Mortalidade das Larvas (%)
Controle	1%	0,5	2,0	0
B1	1%	0,5	2,0	54,03
B3	1%	0,5	2,0	57,48
B6	1%	0,5	2,0	0
B8	1%	0,5	2,0	84,03
B11	1%	0,5	2,0	0
B13	1%	0,5	2,0	0
B14	1%	0,5	2,0	0
B16	1%	0,5	2,0	0
F4	1%	0,5	2,0	52,68
F5	1%	0,5	2,0	0

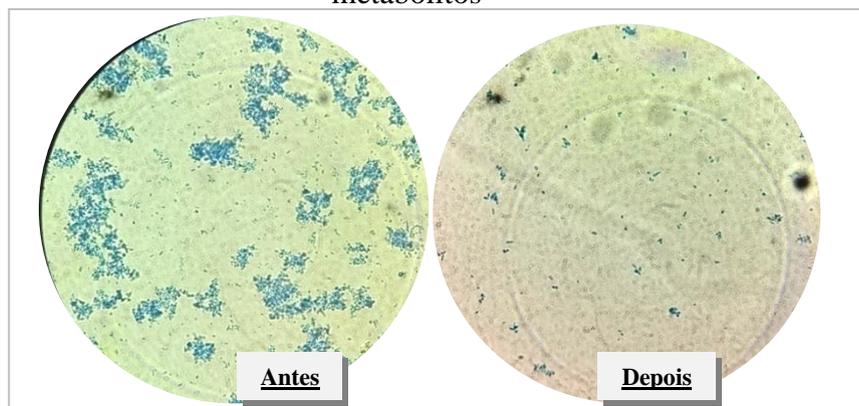
Dentre os extratos microbianos, B8 (*Serratia marcescens*) manifestou melhor desempenho no teste de imersão, causando a morte de 84,04% das larvas do inseto. Portanto, pode-se inferir que as bactérias *Pseudomonas protegens* (B03), *Micrococcus yunnanensis* (B06), *Serratia marcescens* (B08), e o fungo *Colletotrichum siamense* (F4) têm predisposição para serem utilizados como agentes biocontroladores de carrapatos bovinos.

3.5 Observação da alteração da micromorfologia

A contagem de esporos após o período de imersão dos inóculos

fitopatogênicos nos líquidos metabólicos provenientes do metabolismo microbiano dos isolados, apresentou valores reduzidos em comparação aos controles. Além disso, o número de esporos germinados também se mostrou significativamente menor, conforme mostrado na Figura 6.

Figura 6. Esporos de *Rhizoctonia solani* (FP4) antes e depois da exposição aos metabólitos



Observa-se ainda, na Tabela 9, que houve inibição da germinação do FP4 (*Rhizoctonia solani*) frente a todos os extratos microbianos, o que nos leva a inferir que os líquidos metabólicos insento de células contém para biofungicidas como alternativa ao uso de pesticidas que levam ao aumento da resistência de muitos fitopatógenos como o FP4. Este, causa grandes prejuízos em diferentes tipos de plantações, sendo uma ameaça preocupante ao setor agrícola.

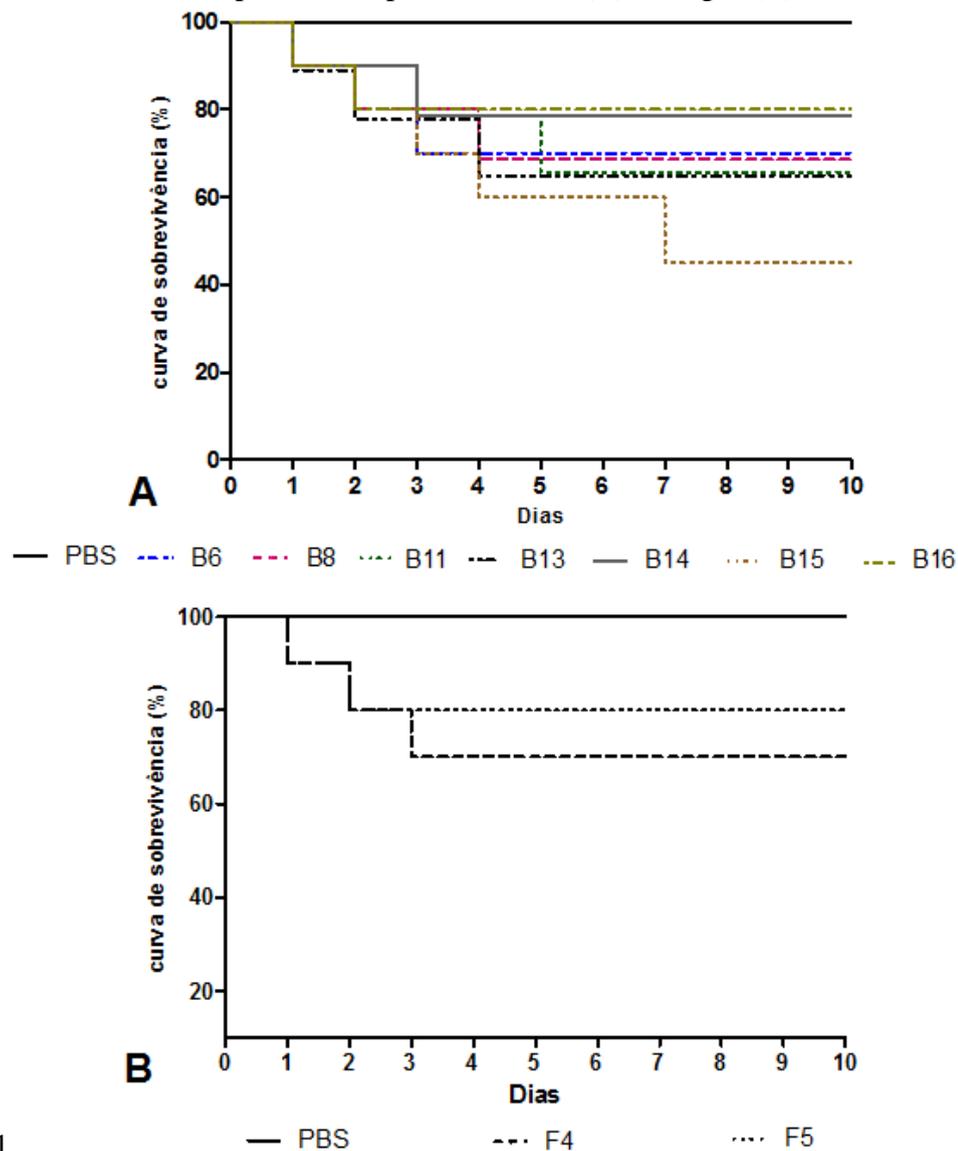
Tabela 9. Germinação após 14h de exposição aos metabólitos produzidos pelos isolados de manguezal

Código	FP1	FP2	FP3	FP4	FP5
Controle	18**	15**	10**	12**	8*
B6		0	1	0	
B8		1	0	0	
B13	1	1	1	2	0
B11		2			
B14	3	2		2	
B15				3	
B16				0	
F4				0	
F5	2			4	

*(-) ausência de esporos ** $p < 0.01$ e $p^* > 0.05$

3.6 Avaliação da Toxicidade em Modelo alternativo

Figura 7. Curva de sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* após 10 dias de exposição aos metabólitos produzidos pelas bactérias (A) e fungos (B) isolados de



manguezal

A relação teste-controle realizada em modelo alternativo para avaliação da toxicidade dos líquidos metabólicos quanto ao grau de comprometimento causado a larva do inseto *Tenebrio molitor*, resultou na curva de sobrevivência das larvas ao longo de 10 dias, apresentada na Figura 7 e nos leva a inferir que os metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos *Bacillus humi* (B11) e a bactéria do gênero *Diaporthe* sp. (F5) são de boa eficácia e baixa toxicidade aguda. Ao passo que, os metabólitos produzidos por *Micrococcus yunnanensis* (B06) e *Serratia marcescens* (B08), apresentaram toxicidade mediana e o *Colletotrichum siamense* (F5), moderadamente tóxico.

Quando realizada a análise de correlação de Sperman com os dados de toxicidade do metabólito em relação ao controle se pode observar que há

diferença estatística significativa entre todos os metabólitos testados em relação ao controle PBS. O teste descrito nos permite prever a respeito da viabilidade e necessidade de que futuros testes de toxicidade em células e/ou modelos mais avançados sejam realizados.

4. Discussão

Os valores obtidos na caracterização físico-química corroboram com os dados de Pan et al. (2017), que avaliaram sedimento de manguezal contaminado com polibromidato difenil éter (composto lipofílico muito utilizado em algumas indústrias) e relataram teor de matéria orgânica em torno de 15 a 20%, valores semelhantes ao encontrado neste trabalho. Todavia, os autores descreveram que no sedimento estudado a textura siltosa predominou sobre a arenosa, resultado diferente dos encontrados neste trabalho. Saravanakumar et al. (2018) também caracterizaram sedimentos de manguezal em Vellar-Coleroon no Sudoeste da Índia e relataram um teor de areia fina predominante na composição do sedimento, além de valores de pH 7.2 a 7.6, semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

Os resultados obtidos na identificação corroboram com dados de Saravanakumar et al. (2018), que isolaram diferentes grupos microbianos de sedimento de manguezal em uma região estuarina na Índia. Os autores relataram o isolamento de bactérias Gram positivas e negativas, bem como fungos filamentosos. Correia et al. (2014) isolaram 36 bactérias de sedimento de mangue da Lagoa do Araçá-PE, dentre as quais se encontram o gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Micrococcus* que também foram encontrados nesse trabalho.

Para extração de metabólitos secundários, a utilização do acetato de etila é vantajosa por sua boa eficiência associada ao baixo custo se comparada a outros solventes como álcool isoamílico, hexano ou metanol (MINOTTO, 2014). Os extratos microbianos alcançados demonstraram rendimento considerável assim como nos resultados de WITUSK (2018), que caracterizou metabólitos secundários produzidos *Streptomyces* sp. frente a fitopatógenos, cuja a obtenção do extrato se deu também por técnica líquido-líquido. Além disso, o autor relatou em seu trabalho que seus isolados também apresentaram atividade biológica com formação de halos frente a fitopatógenos, dentre os quais estão *Fusarium* sp e *Macrophomina phaseolina*.

Os ensaios de atividade biológica realizados no presente trabalho também foram executados por Amorim et al. (2020) em seu screening microbiano para selecionar microrganismos endofíticos capazes de produzir

e secretar metabólitos secundários inibidores de *Pseudomonas* sp. Os autores descrevem a formação de halos de inibição tanto no ensaio em meio sólido (bloco de gelose), quanto no teste de difusão em ágar (ensaio em meio líquido).

As respostas resultantes da investigação de quitinase corroboram com resultados de uma pesquisa desenvolvida por Júnior (2017), onde em um estudo sobre a hidrólise enzimática de quitina observa-se a *Serratia marcescens* dentre as bactérias produtoras de quitinase. Além disso, o autor aponta que a combinação de enzimas de um fungo filamentosos e *Serratia marcescens* foram capazes de degradar totalmente concentrações elevadas de quitina. Em seu trabalho, Villarreal-Delgado et al. (2018) descrevem o gênero *Bacillus* como grandes produtores de uma diversidade de enzimas líticas extracelulares, dentre elas, a celulase, amilase, proteinase e quitinase que podem ser utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas.

Diante do potencial produtor de quitinase característico de agentes biocontroladores de fungos e insetos, ressalta-se a importância dos microrganismos entomopatogênicos como biopesticidas promissores para o controle biológico de carrapatos, sendo uma alternativa aos carrapaticidas químicos. A exemplo, *Serratia marcescens*, bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, já descritos na literatura. (JÚNIOR, 2017).

De acordo com Diniz (2017), o fator esporulação é considerado mais influente que o crescimento vegetativo, devido aos esporos serem as estruturas responsáveis pela disseminação do fungo no ambiente além de proporcionar o início da infecção no campo. Além disso, como apontam Ribeiro et al. (2015), o conhecimento a respeito da ação de bioextratos sobre a germinação de isolados fúngicos é extremamente importante quando se almeja utilizá-los em conjunto no controle biológico de insetos-praga, visto que, a germinação é a primeira etapa na infecção do fungo, a qual tem início a partir da adesão dos esporos ao tegumento do inseto. Desta forma, quando o extrato reduz ou inibe a germinação dos conídios, provavelmente reduzirá a eficiência dos fungos no controle de pragas, bem como o estabelecimento de epizootias em campo (DINIZ, 2017; SILVA, 2021).

É importante ressaltar que *Rhizoctonia solani* é um dos fitopatógenos que mais desperta a preocupação e interesse por sua ocorrência em diferentes tipos de culturas importantes e pelo aumento da sua resistência resultante do uso indiscriminado de agroquímicos (GOUDA et al., 2016; ZAMOUN et al., 2017). Logo, o presente trabalho cresce em relevância, pois vislumbra metabólitos frutos de isolados de mangue capazes de inibir *Rhizoctonia solani* (FP4), embora já descrito na literatura como patógeno agrícola de resistência crescente.

O modelo alternativo com larvas de *Tenebrio molitor* tem sido bastante empregado como alternativa ao uso de animais, garantindo redução de custo e confiabilidade dos resultados a (MOREY et al., 2016). Amplamente utilizado para avaliação de atividade antimicrobiana, inseticida e citotoxicidade (VAN DER VALK; VAN DER MEIJDEN, 2014; WANG, et al 2015), por ser uma forma mais direta de constatar se o composto é tóxico ou não (SANGKANU et al. 2017). Silva (2017), utilizou larvas de *Tenebrio molitor* para avaliação da atividade antioxidante de um extrato orgânico, enquanto que, Amorim et al. (2020), assim como neste trabalho, utilizou esse modelo alternativo para avaliação da toxicidade de metabólitos microbianos produzidos por endofíticos.

5. Conclusão

Diante do exposto, torna-se evidente que o ecossistema de manguezal da região analisada é dotado de microrganismos cultiváveis com potencial biotecnológico, que apresentam atividade antibiótica frente a patógenos agrícolas e a carrapato bovino conforme resultados demonstrados, sendo possível a extração dos metabólitos secretados pelos isolados promissores através de técnicas de baixo custo e boa eficiência.

Em consonância aos metabólitos secundários extraídos, testes de toxicidade nos levam a conjectura de que estes são, em sua maioria, de baixa toxicidade aguda e eficazes frente a modelo alternativo. Faz-se, portanto, necessária a continuação de testes de atividade pra corroborar e complementar os resultados obtidos, assim como a realização de outros testes com os metabólitos extraídos que mostraram-se promissores para desenvolvimento de biopesticidas e carrapaticidas que satisfaçam algumas das necessidades do setor agropecuário quanto ao controle biológico de organismos indesejáveis.

REFERÊNCIAS

ALEF, Kassem; NANNIPIERI, Paolo. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Academic Press, 1995.

ALMEIDA, V. C.; JUNIOR, C. C.; FEITOSA, F.; PASTOR, D.; MONTE, G. caracterização estrutural do manguezal do Rio Tabatinga, Suape, Pernambuco, Brasil. **Tropical Oceanography**, v. 42, n. 1, p. 37-47, 2014.

AMORIM, E. A. F et al. Antimicrobial Potential of *Streptomyces ansochromogenes* (PB3) Isolated From a Plant Native to the Amazon Against *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

ARUMUGAM, T. et al. Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 225-233, 2017

AZEVEDO, Allana de. **Efeitos das mudanças climáticas nos manguezais de Santa Catarina durante o Holocenotardio**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém – PA, 2018.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4_ts, p. 493-496, 1966.

BONUGLI-SANTOS, Rafaella C. et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 269, 2015.

BLOTTA, Katia Domingues et al. Fitossociologia comparativa de dois manguezais: Canal de Bertioiga/SP e do estuário da Barra do Rio Una-Peruíbe-SP. **UnisantaBioScience**, v. 5, n. 3, p. 271-282, 2016.

BUTLER, Mark S.; ROBERTSON, Avril AB; COOPER, Matthew A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural product reports**, v. 31, n. 11, p. 1612-1661, 2014.

BROWN, Eric D.; WRIGHT, Gerard D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336-343, 2016.

CLARK, Francis Edward. Agar-Plate Method for Total Microbial Count 1. **Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties**, n. methodsofsoilanb, p. 1460-1466, 1965.

CLSI publication M100-S21 Suggested Grouping of US-FDA. **Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories**, 2011.

CORREIA, J. L. A. et al. Isolamento, identificação e avaliação do potencial

enzimático de bactérias autóctones de sedimento de mangue da Lagoa do Araçá-PE. In: **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 2014. p. 19-22.

DE ABREU, J. A. S; ROVIDA, A. F. S; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, 2015

DIAS, Léo Ruben Lopes et al. Bioprospecção de Microorganismos de Interesse Biotecnológico Isolados em Ecossistema de Manguezal. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 9, n. 1, p. 24-30, 2017.

DINIZ, Athaline Gonçalves. **Avaliação do efeito bioinseticida de isolados do complexo de espécies Fusarium incarnatum-equiseti combinados a extratos de Paubrasiliaechinata no controle de Dactylopusopuntiae**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

EMBRAPA: MANUAL DE MÉTODOS DE ANÁLISE DE SOLOS. **Embrapa Solos**, p. 230. Rio de Janeiro 2011.

FRAGOSO, Cynara. **Mercúrio e composição Isotópica de Caranguejos em Manguezais Brasileiros: Relação entre hábitos alimentares, nível trófico e biomagnificação**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ, 2019.

GOUDA, Sushanto et al. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1538, 2016.

KIELISZEK, Marek et al. Biotechnological use of Candida yeasts in the food industry: a review. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 185-198, 2017.

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

INSTITUTO CHICOMENDES, E. Conservação da Biodiversidade. Atlas dos manguezais do Brasil. **Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2018.

JOLY, Carlos A. et al. Apresentando o diagnóstico brasileiro de biodiversidade e serviços ecossistêmicos. **Embrapa Solos-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2019.

JUNIOR, Aloisio Freitas Chagas et al. AÇÃO DE Trichoderma spp. NO CONTROLE DE Fusarium sp., Rhizoctoniasolani E Sclerotiumrolfsii. **AGRI-ENVIRONMENTAL SCIENCES**, v. 4, n. 2, p. 9-15, 2018.

JÚNIOR, A. G. B et al. **Variabilidade genética para a produção de quitinase em coleção de fungos da caatinga com potencial aplicação no controle biológico de**

pragas. Universidade de Federal Campina Grande - PB, 2017.

KLAFKE, G.M., SABATINI, G.A., ALBUQUERQUE, T.A., MARTINS, J.R., KEMP, D.H., MILLER, R.J., SCHUMAKER, T.T. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.** 142, 386–390, 2006.

KOLLA, N. J. P; VIJAYALAKSHMI, M. Chitinase production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 725-733, 2009.

KUMAR, J. G. S. P. et al. Bioactivity assessment of Indian origin—mangrove actinobacteria against *Candida albicans*. **Marine drugs**, v. 16, n. 2, p. 60, 2018.

LIMA, N. F. et al. Registros geológicos e formação da Baía de Guanabara. **SEIXAS FILHO, JT Baías do Rio de Janeiro: Baía de Guanabara. Rio de Janeiro: HP Comunicação**, p. 7-22, 2019.

LOURENÇO, Marcus Venicius de Mello. **Contexto genômico e expressão de genes envolvidos na redução do sulfato em solos de manguezal.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2017.

MAIA, R. C. Manguezais do Ceará. **Recife: Imprima**, 2016.

MASON, Olivia U. et al. Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. **The ISME journal**, v. 8, n. 7, p. 1464-1475, 2014.

MATSUURA, T. **Caracterização taxonômica de actinomicetosendofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobromagrandiflorum* Schum).** Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2004

MINOTTO, Elisandra. **Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o biocontrole de *Bipolarissorokiniana*.** Tese de Doutorado. UFRGS-Porto Alegre , 2014.

MORAIS, J.F. et al. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista UNINGÁ Review**, v. 17, n. 1, 2014.

MOREIRA, J.F.; BRITO, I. da S.; FILHO, M. S. Ocupação desordenada sobre os manguezais da Ilha do Maranhão. In: FARIAS FILHO, M.S. e CELERI, M.J. (Org.) **Geografia da Ilha do Maranhão.** São Luís: EDUFMA, 2015.

MOREY, A. T et al. Atividade antifúngica de taninos condensados de *Stryphnodendron adstringens*: efeito no crescimento e nas propriedades de adesão de *Candida tropicalis*. **Biotecnologia farmacêutica atual** , v. 17, n. 4, pág. 365-375,

2016.

NANDHINI, C. et al. Isolation, screening and identification of cellulolytic marine actinobacteria from the mangrove sediment of burmanallah, the andaman. **International Journal of Current Research in Life Sciences**, v. 7, n. 04, p. 1566-1571, 2018.

PAN, Ying et al. Vertical distribution of dehalogenating bacteria in mangrove sediment and their potential to remove polybrominated diphenyl ether contamination. **Marine pollution bulletin**, v. 124, n. 2, p. 1055-1062, 2017.

PAULA, Nigella Mendes de et al. **Potencial biotecnológico de fungos de ecossistema manguezal**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2019.

PEREIRA, Eduarda Bezerra; BARROS, Fernanda Dantas; DE HOLLANDA, Luciana Maria. Bioprospecção de bactérias produtoras de antimicrobianos isoladas dos solos de diferentes manguezais do estado de Sergipe. **Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq**, n. 21, 2019.

RIBEIRO, Nathalia Pereira et al. Controle alternativo de caruncho do bambu (*Dinoderus minutus*-Fabricius, 1975, Coleóptera: Bostrichidae) à base de extratos vegetais. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, 2015.

SALES, C. R. **Inibição do crescimento de Spodoptera Frugiperda e fitopatógenos causados por isolados bacterianos obtidos de lagartas infectadas com microrganismos do solo**. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal – SP, 2021.

SANGKANU, Suthinee et al. Evaluation of antibacterial potential of mangrove sediment-derived actinomycetes. **Microbial pathogenesis**, v. 112, p. 303-312, 2017.

SARAVANAKUMAR, Kandasamy et al. Soil-microbial communities indexing from mangroves rhizosphere and barren sandy habitats. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 58-68, 2018.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. A diversidade do ecossistema manguezal. **In: Atlas do Manguezais do Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**. Brasília, 2018.

SILVA, Ingrid Reis da. **Caracterização de compostos antimicrobianos produzidos por Streptomyces sp.** 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

SILVA, João Marcos Ribeiro et al. **Bactérias endofíticas e seu potencial para a promoção do crescimento de cana-de-açúcar: Uma revisão de literatura**. Instituto Federal Goiano (IFG), Goiás, 2021.

SILVA, Tiago Fonseca. **Bioprospecção de compostos naturais da Caatinga capazes de aumentar a longevidade e a resistência ao estresse em Tenebriomolitor**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

TOLOZA-MORENO, Deisy Lisseth; LIZARAZO-FORERO, Luz Marina; URIBE-VÉLEZ, Daniel. Antagonist capacity of bacteria isolated from cape gooseberry cultures (*Physalis peruviana* L.) for biological control of *Fusarium oxysporum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 1-12, 2020.

TOMLINSON, P. Barry. **The botany of mangroves**. Cambridge University Press, 2016.

TRISUWAN, Kongkiat et al. Epoxydons and a pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. **Journal of Natural products**, v. 71, n. 8, p. 1323-1326, 2008.

VAN DER VALK, Tom; VAN DER MEIJDEN, Arie. Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. **Toxicon**, v. 88, p. 38-43, 2014.

VIEGAS, Alexsandro Mendonça et al. Mapeamento e determinação da biomassa de manguezais através de imagens de satélite e dados dendométricos no município de Alcântara-MA. **Meio Ambiente: Inovação com Sustentabilidade**, p. 10, 2019.

VILLARREAL-DELGADO, María Fernanda et al. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 36, n. 1, p. 95-130, 2018.

WANG, Xuegui et al. The effect of chemical composition and bioactivity of several essential oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, 2015.

WITUSK, João Paulo Duarte. **Caracterização de Metabólitos Secundários Produzidos por Isolados de Streptomyces com Atividade Contra Fungos Fitopatogênicos**. Dissertação de Mestrado. UFRGS - Porto Alegre, 2018.

XU, Jing. Bioactive natural products derived from mangrove-associated microbes. **RSC Advances**, v. 5, n. 2, p. 841-892, 2015.

ZAMOUM, Miyada et al. Desenvolvimento de formulações à base de esporos de *Streptomyces rochei* cepa PTL2 para biocontrole de *Rhizoctonia solani* tombamento de mudas de tomate. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 6, pág. 723-738, 2017.