

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BRUNA FINARDI

**DETECÇÃO DE ANTAGONISMO EM BACTÉRIAS
HALOTOLERANTES DO LAGO DE ITAIPU – SANTA HELENA, PR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**SANTA HELENA
2019**

BRUNA FINARDI

**DETECÇÃO DE ANTAGONISMO EM BACTÉRIAS
HALOTOLERANTES DO LAGO DE ITAIPU – SANTA HELENA, PR**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Erika Izumi

**SANTA HELENA
2019**

TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNA FINARDI

DETECÇÃO DE ANTAGONISMO EM BACTÉRIAS HALOTOLERANTES DO LAGO DE ITAIPU – SANTA HELENA, PR

Este trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 18 de novembro de 2019, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado(a) em Ciências Biológicas, outorgado pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O aluno foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Daian Guilherme Pinto de Oliveirar
UTFPR

Prof. Dr. Daniel Rodrigues Blanco
UTFPR

Prof. Dra. Erika Izumi
Orientador(a) – UTFPR

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

Dedico este trabalho à minha família, por realmente acreditar no meu potencial, apoiando e investindo em meu desenvolvimento durante todo o período do curso. Especialmente à minha mãe, Eliane, e à minha avó Dona Maria, as melhores orientadoras da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, que me acolheu e me apresentou às maravilhas do universo científico.

Aos profissionais que conheci na Universidade e somaram em minha trajetória acadêmica, especialmente à minha orientadora, Profa. Dra. Erika Izumi.

À Profa. Dra. Denise Lange, pela excelente orientação durante o período de ausência da Profa. Dra. Erika, na primeira fase deste trabalho.

Aos técnicos e demais servidores do laboratório, responsáveis pelo zelo e manutenção impecável do nosso ambiente de trabalho.

À minha família, mais uma vez, por todo o investimento aplicado em minha carreira até aqui... Sem vocês, absolutamente nada disso seria possível. Sei que não foi, e nunca será fácil para nós, mas também sei que um dia tudo isso valerá a pena.

A cada afeto cultivado nesta nova cidade, pela companhia e amparo nos momentos em que eu mais precisei. Seja com abrigo (naqueles momentos em que estar na minha nova casa era insuportável), dinheiro emprestado, palavras de conforto, um abraço, e até mesmo com uma cerveja e uma boa conversa.

Direta ou indiretamente, todas essas pessoas me forneceram todo o suporte necessário que viabilizou a consumação desta monografia. Vocês não imaginam o tamanho da força que me deram para que eu pudesse continuar. Muito obrigada, este trabalho também é de vocês!

“Tudo depende do tipo de lente que você
utiliza para ver as coisas.”

(GAARDER, 1991).

RESUMO

FINARDI, Bruna. Detecção de antagonismo em bactérias halotolerantes do lago de Itaipu – Santa Helena, PR. 2019. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas), Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2019.

O filo *Actinobacteria* é constituído por bactérias Gram positivas conhecidas por sintetizarem diversos compostos bioativos, tais como enzimas e antimicrobianos empregados em diversas atividades humanas. Partindo deste pressuposto, o objetivo desta pesquisa foi isolar actinobactérias halotolerantes do Lago de Itaipu para verificar sua capacidade de antagonismo frente a alguns patógenos de interesse clínico e econômico. Na concentração de 7% de NaCl foram obtidos nove isolados halotolerantes cuja capacidade de antagonismo foi posteriormente detectada através de dois testes antimicrobianos distintos: de difusão em ágar, contra leveduras e bactérias; e de crescimento radial, contra fungos filamentosos. O antagonismo foi observado em seis dentre os nove isolados obtidos, ou seja, mais da metade das amostras (aproximadamente 67%) apresentou atividade inibitória. O teste antimicrobiano de difusão em ágar demonstrou que quatro isolados inibiram o crescimento de *Bacillus cereus*. Com relação ao teste de atividade antifúngica, foram identificados quatro halotolerantes que inibiram o crescimento de *Fusarium graminearum* e ao menos um isolado que expressou antagonismo contra *Trichophyton rubrum*. O estudo evidenciou que o Lago de Itaipu, que recebe água de rios que drenam parte do Oeste do país, pode apresentar uma significativa quantidade de isolados promissores quanto à produção de moléculas com propriedades antimicrobianas.

Palavras chave: Bioprospecção. Antibiose. *Bacillus cereus*. *Fusarium graminearum*. *Trichophyton rubrum*.

ABSTRACT

FINARDI, Bruna. Detection of antagonism in Itaipu Lake halotolerant bacteria - Santa Helena, PR. 2019. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas), Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2019.

The phylum *Actinobacteria* is composed of Gram-positive bacteria well known for its capacity to synthesize a wide variety of bioactive compounds such as enzymes and antimicrobials employed in many human activities. Based on this theoretical assumptions, the purpose of this research was to isolate the halotolerant actinobacteria from Itaipu Lake to verify their antagonism capacity against some pathogens of clinical and economic interest. Nine halotolerant isolates could be established at 7% NaCl concentration whose antagonistic activity could be detected by two distinct antimicrobial tests: agar diffusion, against yeast and statistics; and radial growth, against filamentous fungi. The antagonism was observed in six out of nine microbial isolates, in other words, more than half of the samples expressed inhibitory activity. The antimicrobial agar diffusion test showed inhibition of *Bacillus cereus* growth by four out of nine halotolerant isolates. Regarding the antifungal activity test, four out nine halotolerant isolates showed antimicrobial activity that inhibited *Fusarium graminearum* growth, and at least one of the microbial isolates expressed antagonism against *Trichophyton rubrum*. This study showed that Itaipu Lake, which receives water from rivers that drain part of the West of the country, may have a significant number of promising isolates for the production of molecules of interest.

Keywords: Bioprospecting. Antibiosis. *Bacillus cereus*. *Fusarium graminearum*. *Trichophyton rubrum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A: Refúgio Biológico de Santa Helena e Lago de Itaipu. B: Mapa do Estado do Paraná. Em vermelho, a cidade de Santa Helena.....	13
Figura 2 – Exemplo de policetídeo produzido por actinobactéria.	21
Figura 3 - Exemplo de peptídeo não-ribossomal produzido por actinobactéria.	22
Figura 4 - Pontos de coleta das amostras de água, no Lago de Itaipu (RBSH). Ponto 1: Canal do Lago; 2: Região de Macrófitas; Região 3: Borda do Lago.	29
Figura 5 - Borda do Lago de Itaipu e região de macrófitas, ao fundo, ambos locais de coleta das amostras de água.	29
Figura 6 - Garrafas utilizadas para o armazenamento da água coletada.	30
Figura 7 - Esquematização dos dois testes antimicrobianos realizados.	33
Figura 8 - Morfotipos dos nove microrganismos isolados da água do lago. A: Isolados de 1 a 5; B: Isolados de 6 a 9.	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ARIE	Área de Relevante Interesse Ecológico
BP3	Bacia Hidrográfica do Rio Paraná 3
Cfa	Clima subtropical, com verão quente.
NaCl	Cloreto de Sódio
RBSH	Refúgio Biológico de Santa Helena

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1.	Objetivo geral.....	13
2.2.	Objetivos específicos.....	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1.	Local de estudo	13
3.1	Actinobacterias	14
3.2.	Bactérias extremófilas	17
3.2	Os microrganismos e a descoberta de novos antimicrobianos.....	20
3.3	Microrganismos de importância clínica e econômica.....	22
3.2.1.	Gênero <i>Candida</i>	22
3.2.2.	Gênero <i>Rhodotorula</i>	24
3.2.3.	Gênero <i>Bacillus</i>	25
3.2.4.	<i>Trichophyton rubrum</i>	26
3.2.5.	<i>Fusarium graminearum</i>	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1.	Local de coleta e amostragem.....	28
4.2.	Obtenção dos isolados microbianos	30
4.3.	Testes antimicrobianos	31
4.3.2.	Teste por difusão em ágar	31
4.3.3.	Teste por crescimento radial	32
5	RESULTADOS	33
5.1	Isolados microbianos	33
5.2	Teste de difusão em ágar	34
5.3	Teste de crescimento radial.....	34
6	DISCUSSÃO	35
7	CONCLUSÕES	38
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39

1 INTRODUÇÃO

O território brasileiro é composto por uma diversidade considerável de ecossistemas, tanto aquáticos, quanto terrestres. Juntos, esses ecossistemas abrigam uma vasta biodiversidade (COUTINHO, 2016). Estima-se que pelo menos cerca de 20% da biodiversidade mundial esteja contida no Brasil (SOUZA et al., 2004). Desta forma, Morais et al. (2018) denominam o país como uma valiosa fonte natural de matérias primas. Infelizmente, apenas nas últimas décadas, a comunidade científica brasileira estabeleceu grupos de pesquisa para a investigação de tamanha diversidade biológica e seu potencial biotecnológico.

Conforme o inciso VII do artigo 7º da Medida Provisória nº. 2.186-16/2001, qualquer atividade exploratória cujo objetivo seja identificar algum componente pertencente ao Patrimônio Genético, bem como informações a respeito do Conhecimento Tradicional Associado e que também apresente potencial uso comercial, é configurada como bioprospecção. A bioprospecção microbiana representa uma ferramenta fundamental na busca por microrganismos produtores de novas moléculas cujas propriedades biológicas sejam de interesse humano (SOUZA et al., 2004), aplicando-se nas mais diversas atividades realizadas pela humanidade no mundo inteiro, dentre elas: o controle de pragas na agricultura, biorremediação, indústria alimentícia, cosmética, têxtil, no biomonitoramento, na formulação de novos fármacos contra patógenos resistentes, e também no tratamento contra fitopatógenos, causadores de uma série de prejuízos econômicos aos agricultores (TAN e ZOU, 2001; STROBEL e DAISY 2003). Até o ano de 2013, mais de 22 mil compostos biologicamente ativos foram obtidos via microrganismos (MORAIS et al., 2018), sendo cerca de 45% destes, provenientes de actinobactérias (BERDY, 2005).

As actinobactérias (antigamente denominados actinomicetos) são bactérias Gram positivas cujas principais características envolvem seu crescimento filamentosos, muito semelhante ao de fungos filamentosos, e a alta concentração de Guaninas e Citosinas em seu DNA (SINGH et al., 2018). Além disso, apresenta ampla variedade morfológica, fisiológica e metabólica, o que lhes permite habitar os mais diversos ambientes (NETT, IKEDA & MOORE, 2009). A principal importância das actinobactérias vem sendo vinculada à produção de antimicrobianos (DEMAIN & SANCHEZ, 2009).

O principal evento que impulsionou a prospecção de produtos de origem microbiana ocorreu em 1928, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, um antimicrobiano sintetizado por um fungo do gênero *Penicillium*, capaz de inibir o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*. A penicilina foi o primeiro medicamento de origem microbiana a ser produzido em grande escala, iniciando assim a busca por outros microrganismos a servirem como fonte de substâncias biologicamente ativas com atividade antagônica frente a outros microrganismos (TAKAHASHI & LUCAS, 2008).

No caso das actinobactérias, acredita-se que estes produtos sejam oriundos das interações entre eles e outras populações do meio, microbianas ou não, além das influências diretas e indiretas de fatores abióticos do próprio ambiente na qual eles se encontram; estes produtos desempenham funções nas associações simbióticas gerando vantagens adaptativas e evolutivas aos microrganismos (MORAIS et al., 2018). Golinska et al. (2015) reafirmam a influência ambiental sobre a diversidade de actinobactérias, bem como sobre os compostos que eles sintetizam.

De acordo com Gibbons et al. (2014), os microrganismos são fundamentais para a manutenção de ambientes aquáticos dulcícolas, uma vez que realizam a ciclagem de compostos orgânicos e atuam diretamente nos ciclos biogeoquímicos desse tipo de ambiente. Devido a fatores físicos como a ação das chuvas, muitos dos microrganismos presentes no ambiente terrestre são lixiviados juntamente com o solo até os ecossistemas aquáticos, aumentando consideravelmente a diversidade microbiana nestes locais (SILVA, 2013).

O Lago de Itaipu está situado no oeste do Estado do Paraná, e segundo a Secretaria do Meio Ambiente (2010), ele compõe a Bacia do Paraná III (BP3). Localizada na mesorregião Oeste do Estado do Paraná, a BP3 apresenta uma área de aproximadamente 8.000 km², abrangendo, parcial ou totalmente, territórios de 28 municípios (DA CUNHA, 2018). Segundo levantamento bibliográfico, os trabalhos voltados à bioprospecção dos microrganismos presentes neste ecossistema são inexistentes.

Em razão da escassez de pesquisas referentes à diversidade e bioprospecção microbiana da região, assim como a inquestionável necessidade da realização de estudos voltados à descoberta de novas fontes naturais para a

produção de compostos de interesse, esta pesquisa teve como objetivo principal investigar a presença desses microrganismos no Lago de Itaipu.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Isolar actinobactérias halotolerantes do Lago de Itaipu para verificar sua capacidade de antagonismo frente a alguns patógenos de interesse clínico e econômico.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a presença e isolar actinobactérias halotolerantes no Lago de Itaipu;
- Determinar as concentrações máximas de NaCl toleradas pelos isolados;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados frente a diversos patógenos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Local de estudo

O local determinado para a realização deste estudo foi o Lago de Itaipu (figura 1A), um lago artificial constituído em decorrência do represamento das águas do Rio Paraná, após a construção da Itaipu Binacional em 1982 (MIRANDA, 2008). O lago encontra-se situado no Refúgio Biológico do município de Santa Helena (RBSH), extremo oeste do estado do Paraná ($24^{\circ}51'37''$ S; $54^{\circ}19'58''$ O) (figura 1B).

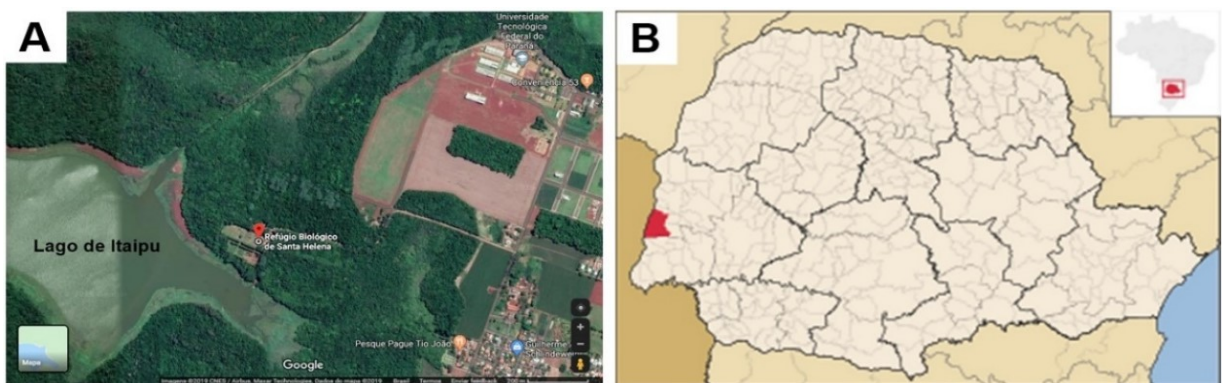


Figura 1 - A: Refúgio Biológico de Santa Helena e Lago de Itaipu. B: Mapa do Estado do Paraná. Em vermelho, a cidade de Santa Helena. Fonte: Google Maps e WikiWand, respectivamente.

O RBSH, na qual encontra-se o Lago de Itaipu, representa uma ARIE (Área de Relevante Interesse Ecológico), uma área de pequena extensão que apresenta pouca ou nenhuma ocupação humana cujas características naturais propicia abrigo a exemplares raros da biota regional. Ele está localizado a meia encosta do rio São Francisco Falso, que representa um braço do Lago de Itaipu devido o represamento do Rio Paraná para a construção da Usina de Itaipu (PLANO DE MANEJO, 2010).

A área caracteriza-se como um ambiente de Mata Atlântica, cuja fitofisionomia predominante é a Floresta Estacional Semidecidual (MARCON et al., 2010) ou ainda, Floresta Tropical sub-caducifolia, caracterizada por duas estações climáticas, chuvosa e seca, cujo estrato vegetal dominante apresenta mais de 50% dos indivíduos desprovidos de folhagens no período seco (PLANO DE MANEJO, 2010). Segundo a classificação de Köppen, o clima predominante na região é caracterizado como subtropical úmido mesotérmico (Cfa).

A área total drenada do rio Paraná até a barragem de Itaipu é de 7.979 km², englobando 28 municípios da costa oeste, desde Foz do Iguaçu até Guaíra (LIMBERGER, 2011). Conforme afirma Miranda (2008), o volume médio total do Lago de Itaipu é de aproximadamente 1.350 km³, 200 quilômetros de extensão em linha reta, apresentando profundidade média de 21,5 metros e abrange 15 municípios.

Em razão de suas características físico-químicas, o Lago de Itaipu, localizado às margens do Refúgio Biológico de Santa Helena, representa um local alvo para a realização de diversos estudos e pesquisas a respeito dos componentes naturais da região.

3.1 Actinobacterias

O domínio *Bacteria* é composto por 84 filos conhecidos (MADIGAN et al., 2016), sendo o Filo Actinobacteria considerado como um dos maiores (FRANÇA, 2016). As actinobactérias (antigamente classificadas como actinobactérias) são organismos capazes de utilizar fontes variadas de carbono e energia. Assim, podem ser classificadas como organismos autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou ainda fototróficos (KENNEDY, 1999); além disso, podem ser anaeróbios facultativos, aeróbios estritos, microaerófilos ou anaeróbios estritos. Embora a maioria seja aeróbia, existem representantes anaeróbios ou anaeróbios facultativos. Crescem

preferencialmente em solos de pH neutro à alcalino, apesar de também desenvolverem-se em solos ácidos (PEREIRA NETO, 1996).

Os indivíduos do filo Actinobacteria também são caracterizados devido à sua elevada diversidade morfológica e metabólica (OLIVEIRA, 2003). A diversidade do grupo baseia-se principalmente em estratégias desenvolvidas para a reprodução, responsáveis por ocasionar as mais diversas formas estruturais de esporos (ENSIGN, 1978). De acordo com Reponen et al. (1998), esses esporos são contaminantes do ar em ambientes como instalações agrícolas e usinas para compostagem de resíduos, além de também serem encontrados em ambientes domésticos que apresentam umidade e mofo.

Além de diversos, os representantes do Filo Actinobacteria geralmente se desenvolvem lentamente e apresentam ramificações filamentosas muito semelhantes a hifas (AGHAMIRIAM & GHASIAN, 2009). Por conta disso, as actinobactérias foram inicialmente classificadas como fungos (FRANÇA, 2016). Somente algum tempo depois da observação de determinadas características, tais como a ausência de núcleo organizado, a presença de flagelos bacterianos e a sensibilidade a fagos e antibióticos, esses organismos foram reclassificados para o Domínio Bacteria (LECHEVALIER, 1970).

Embora todas as características supracitadas sejam extremamente variáveis entre as espécies, existem duas características comuns a todos os organismos deste filo: são bactérias Gram positivas (MONCIARDINI et al., 2014) cujo material genético apresenta elevada concentração de guanina e citosina, que, em alguns casos podem compor até cerca de 70% de suas bases nucleotídicas (MOREIRA, SIQUEIRA et al., 2006; VENTURA et al., 2007; GAO, PARAMANATHAN, GUPTA, 2006; MIAO, DAVIES, 2010; KENNEDY, 1999).

Outra propriedade característica de algumas actinobactérias é a produção de geosmina, um terpeno cuja elevada volatilidade ocasiona o odor de “terra molhada” após períodos chuvosos (CHAUDHARY et al., 2013). Os organismos constituintes deste filo também realizam diversos processos metabólicos que resultam na produção de uma gama de compostos bioativos (ICHIWAKI, 2017).

Apesar de estarem presentes em muitos ambientes diferentes (aquáticos, sedimentos, seres humanos, animais, plantas e até mesmo em alimentos) as actinobactérias são mais frequentemente encontrados no solo (MCCARTHY &

WILLIAMS, 1992). O local no qual estes organismos se encontram é um importante fator determinante para as funções que eles desempenham (FRANÇA, 2016). São microrganismos qualitativa e quantitativamente relevantes para a manutenção da rizosfera (OLIVEIRA, 2003), uma vez que exercem grande influência sobre o crescimento vegetal e fornecem proteção as raízes contra invasões de microrganismos nocivos às plantas (CRAWFORD et al., 1993) atuando também na formação de micorrizas (OLIVEIRA, 2003).

Determinadas espécies atuam como patógenos (*Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp., e *Propionibacterium* spp., por exemplo), comensais de plantas (*Leifsonia* spp.), fixadoras de nitrogênio (*Frankia* spp.) (VENTURA et al., 2007; BULL, 2004), realizadoras de degradação da matéria orgânica, atuando sobre compostos como a celulose, lignina e quitina (GAVA, 2002), desempenhando uma importante função na ciclagem e disponibilização de nutrientes e também promovendo a possibilidade de sua aplicação em processos de biorremediação (*Tsukamurella* sp. e *Cellulosimicrobium* sp.) (ESCUDERO et al., 2012).

Além disso, as actinobactérias são conhecidas por seu metabolismo secundário, responsável pela produção de aproximadamente dois terços de todos os antimicrobianos derivados de fontes naturais, além de moléculas com propriedades antitumorais, anti-helmínticas e antifúngicas (FERREIRA et al., 2016). Assim, são bactérias cuja atuação é de grande importância para o mercado biotecnológico, da medicina e agrônômico. Alguns exemplos conhecidos de antibióticos provenientes destes microrganismos são a estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina, novobiocina, vancomicina, nistatina e anfotericina B (SILVA-LACERDA et al., 2016).

Alguns estudos têm apontado que as bactérias pertencentes a este filo são facilmente encontradas em grande quantidade em solos tropicais (FRANÇA, 2016). As actinobactérias podem representar até 30% de toda a comunidade microbiana que compõe o solo de ambientes tropicais, destacando a importância da atuação destes ambientes como reservatório natural da biodiversidade destes organismos (KUSTER, 1968; GRAY & WILLIAMS, 1971 apud KENNEDY, 1999).

Acredita-se que a presença dessas bactérias em ambientes aquáticos esteja relacionada a processos mecânicos do solo, como a lixiviação (RODRIGUES, 2006),

essa consideração baseia-se no fato de a diversidade de actinobactérias do solo ser a mesma daquela encontrada nos ambientes aquáticos.

3.2. Bactérias extremófilas

De acordo com Duarte & Lima (2004), o panorama atual da história evolutiva dos seres vivos é muito bem compreendido pela comunidade científica, configurando-se como um grande registro em construção, constituído por evidências fossilíferas, geológicas e biológicas. No decorrer do processo evolutivo, uma série de eventos foi responsável para que novas espécies sobrevivessem, até que finalmente a fauna, flora e microbiota atual fossem capazes de se estabelecer.

Nos primórdios de sua formação, o planeta Terra configurava-se como um ambiente inóspito, cujas condições extremas de temperatura, pressão, oxigênio, salinidade, pH, radiação, entre outros, impossibilitava que a maioria das formas de vida conhecidas atualmente se desenvolvesse (ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001). Dodd et al. (2017) apresentam em sua pesquisa recente um registro fóssil da forma de vida mais antiga conhecida até então, microfósseis em rochas que datam de pelo menos 3,7 bilhões de anos. Trata-se de organismos unicelulares (ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001) e completamente adaptados ao cenário descrito: os microrganismos extremófilos (REZENDE, 2010).

MacElroy, em 1974, foi o primeiro a designar o termo “extremófilo” referindo-se aos organismos capazes de se proliferarem em ambientes que apresentam condições extremas (SANTOS et al., 2001). Segundo Rezende (2010), existe certa relatividade ao se definir um “ambiente extremo”, uma vez que, enquanto é extremo do ponto de vista de um grupo de organismos, é essencial para a sobrevivência de outro grupo. Sendo assim, a mesma autora define os extremófilos como um grupo de seres vivos capazes de desenvolver e proliferar em condições de letalidade para a maioria dos demais grupos.

De acordo com Madigan et al. (2016), os extremófilos são um grupo grande e notável, especialmente composto por organismos do Domínio Archaea e Domínio Bacteria, cujas propriedades coletivas são definidas conforme os limites físicos e químicos do ambiente. Os extremófilos têm sido amplamente estudados no que diz respeito à sua diversidade, bem como os mecanismos moleculares e regulatórios envolvidos em seu metabolismo tolerante a condições extremas específicas

(SATYANARAYANA et al., 2005). Dentre os diversos grupos de microrganismos extremófilos (Quadro 1), encontram-se os halotolerantes e halófilos extremos (COUTINHO, 2012), organismos que sofreram alterações para sobreviverem em ambientes salinos (ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001).

Quadro 1 - Classificação de organismos extremófilos conforme os parâmetros ambientais.

Parâmetro Ambiental	Tipo	Definição
Temperatura	Hipertermófilos	Crescem em temperaturas > 80°C.
	Termófilos	Crescem entre 60 e 80°C.
	Mesófilos	Crescem entre 15 e 60°C.
	Psicrófilos	Crescem em temperaturas < 15°C.
Radiação	Radioresistentes	Resistentes à alta radiação.
Pressão	Barófilos	Afinidade por alta pressão.
Gravidade	Hipergravidade	> 1g.
	Hipogravidade	< 1g.
Vácuo	-	Tolerantes ao vácuo.
Dessecação	Xerófilos	Anidro bióticos.
Salinidade	Halófilos	Afinidade por NaCl.
pH	Alcalifílicos	pH > 9.
	Acidófilos	pH < 6.
Oxigênio	Anaeróbios	Não toleram O ₂ .
	Microaerófilos	Toleram O ₂ em baixa concentração.
	Aeróbios	Dependentes de O ₂ .
Extremos químicos	Metalotolerantes	Tolerantes a metais pesados.

Fonte: Rothschild & Mancinelli, Nature (2001), adaptada.

O principal mecanismo que este grupo desenvolveu para obter sucesso evolutivo na colonização desses ambientes ocorre a nível molecular, mais especificamente relacionado às proteínas (PAUL et al., 2008). As proteínas desses organismos apresentam um aumento drástico na quantidade de resíduos carregados negativamente (MADIGAN et al., 2016), especialmente os ácidos glutâmico e aspártico (COUTINHO, 2012), encontrados em abundância pela superfície da

proteína, responsável pela redução do conteúdo hidrofóbico total destas moléculas (TADEO et al., 2009).

Outros dois mecanismos cruciais que os halófilos desenvolveram para lidar com a perda de água para o ambiente são: a osmorregulação (utilização do transporte de íons para regulação da pressão osmótica por meio da homeostase) e a osmoconformação (utilização de solutos compatíveis para a manter a pressão osmótica intracelular equivalente à extracelular) (YANCEY, 2005). Na maioria das bactérias é utilizado o íon K^+ para contrabalancear a pressão osmótica (ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001).

Rosas Ramírez & Duran Ramírez (2012) diferenciam halófilos extremos dos halotolerantes ou ainda, halófilos moderados (Quadro 2) apontando que são halófilos extremos aqueles cujas condições são tão específicas para ambientes salinos extremos que acabam tornando-se restritos somente a esse tipo de ambiente, o que inviabiliza completamente a sua sobrevivência em habitats com níveis salinos inferiores; o contrário ocorre no caso dos halotolerantes, uma vez que estes se utilizam de estratégias adaptativas muito mais flexíveis.

Essas estratégias incluem a acumulação de solutos compatíveis e de baixa massa molecular que, mesmo em concentrações elevadas não causam danos às células; tal estratégia não altera os componentes celulares, permitindo que ocorram respostas mais rápidas às variações de salinidade do meio em que se encontram (ROSAS RAMÍREZ & DURAN RAMÍREZ, 2012).

Quadro 2 - Classificação de halófilos em função da salinidade.

Halófilos	Concentrações de NaCl
Extremos	Acima de 20%, restritos a ambientes salinos.
Moderados	Entre 10 e 20%, restritos a ambientes salinos.
Halotolerantes	Toleram salinidade, encontrados em ambientes não salinos.

Fonte: Rosas Ramírez & Duran Ramírez (2012), adaptada.

Em 1975, foi descrita por Gochner et al., pela primeira vez na bibliografia, uma espécie de actinobactéria capaz de crescer em altas concentrações de salinidade, a *Actinopolyspora halophila*. Dezesseis anos depois, em 1991, foi relatado a segunda actinobactéria halófila, a *Actinopolyspora mortivallis* (YOSHIDA

et al., 1991). Nos anos seguintes, até 2012, foram relatados mais de 15 membros que compõem este grupo, sendo assim, até o atual momento, a quantidade de actinobactérias halotolerantes e halofílicas conhecida ainda é pouco representativa. (ROSAS RAMÍREZ & DURAN RAMÍREZ, 2012).

3.2 Os microrganismos e a descoberta de novos antimicrobianos

Em virtude de uma série de fatores, de ordem natural ou artificial - e neste último caso destaca-se principalmente o uso indiscriminado de antibióticos - ocorre o fenômeno de resistência desenvolvida por microrganismos patogênicos frente aos antimicrobianos disponíveis no mercado atualmente. O fenômeno em questão representa um grande risco para a saúde pública uma vez que, ao se reduzir a eficácia dos antimicrobianos, a realização segura de procedimentos cirúrgicos, quimioterapia, cuidados com bebês prematuros e demais terapias antimicrobianas torna-se impossível (MARCONI, 2019). Por esta razão, o desenvolvimento de novos produtos de origem natural cujas propriedades substituam a função antimicrobiana dos medicamentos ineficazes, torna-se uma das alternativas mais viáveis para lidar com o problema em questão (SENTHIL-RAJAN et al., 2013).

Na última década, os ambientes naturais têm se mostrado uma importante fonte de moléculas bioativas, precursoras dos novos fármacos que chegam ao mercado a cada ano (QIN et al., 2011). De acordo com o último estudo realizado por Newman & Cragg (2012) a respeito de novos fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2010, dentre as 1073 moléculas bioativas aprovadas pela FDA EUA (Food and Drug Administration) durante este período, 64% delas provém de fontes naturais, enquanto apenas 36% são substâncias completamente sintéticas. Em razão da síntese de um vasto repertório de metabólitos secundários, uma das fontes naturais mais promissoras para esta finalidade são os microrganismos (VARELLA, 2015).

Metabólitos secundários são compostos de origem orgânica que apresentam baixo peso molecular, são quimicamente diversos e, ao contrário dos metabólitos primários, tais como os aminoácidos e nucleotídeos, não estão diretamente relacionados às funções vitais do organismo como o crescimento, desenvolvimento e reprodução celular (ICHIWAKI, 2017). Todavia, apesar de não representarem qualquer tipo de essencialidade ao organismo, atuam diretamente na síntese de moléculas de proteção, sinalização e regulação do metabolismo (HASANI;

KARIMINIK; ISSAZADEH, 2014). No passado, apenas os metabólitos secundários que possuíam atividade antimicrobiana, antitumoral ou antiviral eram considerados antibióticos. Todos os metabólitos secundários cuja origem seja microbiana e que não expressem qualquer tipo de atividade regulatória no metabolismo são considerados antibióticos (BERDY, 2005).

Dentre os diversos metabólitos secundários produzidos por actinobactérias, a classe dos policetídeos (PK) está entre as mais relevantes, e, conseqüentemente estão entre as mais estudadas (ICHIWAKI, 2017). Segundo Shen (2003), dentre as inúmeras moléculas bioativas que pertencem a esta classe estão as tetraciclinas, como a clortetraciclina (figura 2), cuja função é antibacteriana e antitumoral e a lovastatina que apresenta função hipolipêmica.

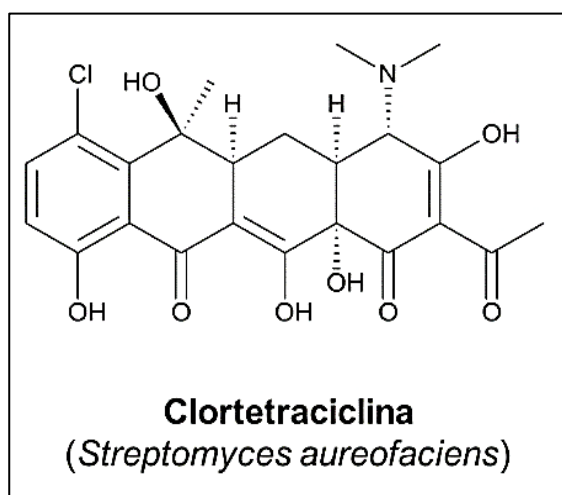


Figura 2 – Exemplo de policetídeo produzido por actinobactéria.
FONTE: Varella (2015), adaptada.

Os peptídeos não-ribossomais (NRP) são outra classe de metabólitos secundários extremamente relevantes. Ichiwaki (2017) justifica que sua importância se deve ao fato de os NRP apresentarem um amplo espectro de bioatividade, incluindo a ação antimicrobiana, imunomoduladora e antitumoral. A ciclosporina, a daptomicina (figura 3) e os β -lactâmicos, como a penicilina G, são exemplos de fármacos que derivam desta molécula.

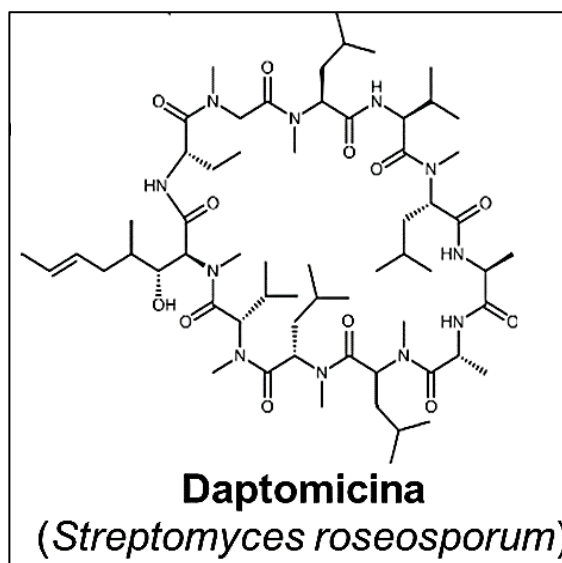


Figura 3 - Exemplo de peptídeo não-ribossomal produzido por actinobactéria.
 FONTE: Varella (2015), adaptada.

Os sideróforos também recebem destaque na pesquisa, porque, além de auxiliar na captação de íons ferro pelo microrganismo, são amplamente utilizados pela indústria biofarmacêutica para mediação da entrada de antibióticos em células patogênicas (SAHA et al., 2013). As fenazinas, produzidas apenas por bactérias, são estudadas em razão de seus efeitos sobre outras populações microbianas, pois elas coadjuvam na formação de biofilme; são aplicadas em antimicrobianos de amplo espectro, e em fármacos antitumorais (ICHIWAKI, 2017). A classe das ectoínas atenua efeitos deletérios decorrentes de situações de estresse fisiológico, agindo sobre a integridade das proteínas, ácidos nucleicos e membranas celulares. Por sua capacidade de inibir a estruturação irregular em proteínas, as ectoínas representam moléculas terapêuticas promissoras contra muitas patologias, como o mal de Alzheimer (PASTOR et al., 2010).

3.3 Microrganismos de importância clínica e econômica

3.2.1. Gênero *Candida*

O gênero é composto por fungos unicelulares, ou leveduriformes, causadores de infecções oportunistas (VIEIRA & SANTOS, 2017). As colônias, em ágar Sabouraud dextrose, apresentam coloração creme ou esbranquiçada cuja textura pode ser lisa ou enrugada, brilhante ou seca (LACAZ et al., 2002; SILVA et al., 2012). São leveduras dimórficas e que podem se apresentar nas formas:

leveduriforme (relacionada à colonização assintomática do hospedeiro), pseudo hifa ou hifa verdadeira (morfotipos patogênicos) (RICHARDSON & MOYES, 2015).

O gênero *Candida* está entre os principais grupos de leveduras causadoras de infecções oportunistas (VIEIRA & SANTOS, 2017; ÁLVARES, SVIDZINSKI & CONSOLARO, 2007). Cerca de 150 a 200 espécies compõem este gênero (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010; VIEIRA & SANTOS, 2017; FREITAS & PIRES, 2016), e estas habitam uma ampla diversidade de nichos corporais dos seres humanos como a orofaringe, cavidade bucal, trato gastrointestinal, sistema urogenital, mucosa do trato respiratório, dobras da pele, vagina e secreções brônquicas (VIEIRA & SANTOS, 2017; ÁLVARES, SVIDZINSKI & CONSOLARO, 2007).

As principais espécies de interesse clínico são: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae* (COLEMAN et al., 1998). Estima-se que aproximadamente 90% das infecções oportunistas são causadas pelas espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (CARDOSO, 2013).

Organismos da espécie *Candida albicans* apresentam-se patogênicas em hospedeiros imunodeficientes, nestes, podendo ocasionar infecção superficial e sistêmica (VIEIRA & SANTOS, 2017). O patógeno pode se manifestar no hospedeiro de três formas distintas: muco cutânea, a forma mais comum e que acomete as cavidades oral e vaginal dos seres humanos (PEIXOTO et al., 2014); cutânea, que pode comprometer as áreas mais superficiais do organismo como os espaços interdigitais, mamas, abaixo das unhas, virilha e axilas (VIEIRA & SANTOS, 2017); e a forma sistêmica ou invasiva, que engloba um amplo espectro de casos clínicos, que varia desde situações isoladas de candidemia até situações na qual fungo presente na corrente sanguínea é disseminado para os órgãos do infectado (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

A candidemia ocasiona infecções profundas que acometem o tecido sanguíneo (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010) e os órgãos por ele irrigados, nesta última forma, a taxa de mortalidade dos hospedeiros geralmente é elevada (CARDOSO, 2013). Embora o maior número de infecções ocasionadas pelo gênero *Candida* sejam atribuídas à *Candida albicans*, outras espécies vêm se tornando cada vez mais prevalentes nas estatísticas epidemiológicas, dentre elas *Candida tropicalis* (KAUR et al., 2016). As infecções causadas por *C. tropicalis* geralmente estão

relacionadas a pacientes hematologicamente comprometidos, como por exemplo, aqueles que apresentam quadro de leucemia mieloide aguda (TANG et al., 2015).

As infecções geralmente ocorrem em ambientes hospitalares, principalmente nas unidades de terapia intensiva (TURNER & BUTLER, 2014). As maiores taxas de mortalidade relativas à candidemia ocasionada por *C. tropicalis* são observadas principalmente na população idosa (WANG et al., 2015). Além disso, *Candida tropicalis* representa um patógeno oportunista em hospedeiros neutropênicos, e é apontada como um dos agentes etiológicos mais comuns em casos de candidemia em pacientes que apresentam neoplasias, principalmente em quadros de leucemia (WINGARD, 1995).

Por outro lado, *Candida parapsilosis* ocorre principalmente em crianças e recém-nascidos prematuros, também internados em Unidades de Terapia Intensiva, nas quais a prevalência de candidemias por *C. parapsilosis* varia entre aproximadamente 17 a 50% dos casos relatados (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). *C. parapsilosis* possui como característica a proliferação em soluções com glicose, além da elevada capacidade em produzir biofilme e frequentemente, colonizar a pele dos hospedeiros (LEVIN et al., 1998).

3.2.2. Gênero *Rhodotorula*

Trata-se de um gênero de leveduras cuja principal característica morfológica é a expressão de pigmentos carotenoides, conferindo às colônias uma coloração alaranjada (WIRTH, 2011). Alguns autores sugerem que o surgimento de fungos como *Rhodotorula* spp. é impulsionado por alterações no ambiente, inclusive no que diz respeito às atividades humanas e a pressão seletiva exercida por fármacos antifúngicos (SEIFI, MAHMOUDABADI & HYDRINIA, 2013).

Este gênero foi descrito pela primeira vez por F.C. Harrison, em 1927, identificando-o como sendo pertencente ao reino Fungi, filo Basidiomycota (WIRTH, 2011). É um fungo cosmopolita cuja presença já foi reportada em muitos habitats distintos, até mesmo em áreas subpolares e polares (COOPER, 2011). Conforme os estudos de Miceli, Díaz & Lee (2011), o gênero pode ser encontrado em ambientes lacustres, no ar, no solo, associados a plantas e em alimentos. O fungo também é considerado habitante transitório da microbiota humana, na qual podem atuar como

saprófitas ou colonizando as mucosas do trato respiratório, gastrointestinal e genital (SEIFI, MAHMOUDABADI & HYDRINIA, 2013).

Além disso, algumas espécies já foram isoladas de equipamentos presentes no ambiente hospitalar como broncoscópios, lentes de contato, máquinas de hemodiálise e outros de contato direto com pacientes como cortinas de banheiro e escovas de dentes, demonstrando a afinidade do gênero por materiais sintéticos (LO RE III, FISHMAN & NACHAMKIN, 2003; HAGAN et al., 1995; PFALLER; DIEKEMA, 2004; GOYAL et al., 2008; García-Suárez et. al, 2011). Por conta disso, estima-se que este gênero seja o terceiro leveduriforme mais frequentemente isolado em hemoculturas (DUBOC DE ALMEIDA et al., 2008).

Até 1985 a levedura não era identificada como um patógeno humano (DUBOC DE ALMEIDA et al., 2008; PERETZ et al., 2018). Entretanto, somente nas três últimas décadas uma ampla gama de espécies vêm sendo associadas aos mais variados quadros clínicos, que englobam desde infecções mais superficiais da pele e anexos, até casos mais graves de fungemias, meningites, ventriculites, septicemias, pneumonias, peritonites e ceratites, especialmente em pacientes imunocomprometidos (KRZYŚCIAK et al., 2010; ALTUN et al., 2014).

Até o momento não foi estabelecido um consenso a respeito do tratamento para infecções causadas por esta levedura, entretanto, a partir de informações contidas no estudo realizado por Wirth & Goldani (2012), o tratamento à base de fluconazol bem como da classe de equinocandinas não são mais eficazes no tratamento de infecções causadas por *Rhodotorula spp.* (WIRTH & GOLDANI, 2012). Isso é justificado pelo seu uso como profilaxia generalizada durante longos períodos, desencadeando o mecanismo de resistência nestes microrganismos (GAMALETSOU, WALSH & SIPSAS, 2018).

3.2.3. Gênero *Bacillus*

Inclui mais de 60 espécies de bactérias Gram positivas (TEJERA-HERNÁNDEZ et al., 2011) cuja morfologia é bacilar e que apresentam motilidade (BETTIOL, 2007). Devido à sua capacidade de esporulação, os microrganismos deste gênero tornam-se mais resistentes a condições ambientais desfavoráveis, como radiação, desidratação e, especialmente, às altas temperaturas (DI PINTO et al., 2013).

Quase todas as espécies do gênero são consideradas patogênicas aos seres humanos (SILVA et al., 2018). *Bacillus cereus* é uma das espécies com maior destaque no gênero *Bacillus sp.* devido a sua grande importância para a saúde pública, uma vez que ela representa uma ameaça pelo fato de sintetizar toxinas durante o armazenamento do produto após o mesmo ser embalado (POIATTI, 2005), causando assim, grandes surtos de enfermidades transmissíveis por alimentos (ETA) (BATT, 2000).

B. cereus é uma espécie bacteriana aeróbica facultativa caracterizada por sua capacidade de formar esporos na presença de oxigênio (SILVA et al., 2018) e que apresenta crescimento ótimo em temperaturas que variam entre 28 e 35°C, tolerando amplas faixas de pH que variam entre 4,9 e 9,3 (ROBINSON, 2014). Sua transmissão geralmente ocorre via alimentos contaminados por seus esporos dormentes e altamente resistentes (MELLEGARD et al., 2011). São bactérias encontradas mais comumente no solo e também podem ser transmitidas facilmente para a vegetação (ROBINSON, 2014).

Por estarem diretamente ligadas à intoxicação alimentar devido à produção de enterotoxinas (SILVA et al., 2018), sua incidência também representa um grande problema à indústria alimentícia por apresentarem capacidade para a formação de biofilme, o que possibilita sua adesão às superfícies de aço inoxidável e pode ocasionar a deterioração dos alimentos e dos equipamentos como os pasteurizadores e tanques de armazenamento (KUMARI, 2016).

3.2.4. *Trichophyton rubrum*

Embora o Gênero *Trichophyton* seja composto por diversas espécies, a que mais se destaca em razão de sua frequência de isolamento é a espécie *Trichophyton rubrum*, responsável por cerca de 70% dos casos de infecções ocasionadas por dermatófitos, principalmente onicomicoses (ROCHA & VIEIRA, 2014) cujas principais características envolvem a tendência à cronicidade e resistência aos tratamentos convencionais (LACAZ et al., 1998). As dermatofitoses são um tipo de dermatomicose, e são desencadeadas pelo grupo de dermatófitos, que parasitam tecidos queratinizados de origem animal como a pele, unhas e pelos (SIQUEIRA et al., 2009). A maioria das infecções ocasionadas por *T. rubrum*

concentram-se primariamente nas regiões tropicais, que apresentam clima quente e úmido (CHIMELLI et al., 2003).

O grupo dos fungos dermatófitos é constituído por três gêneros de fungos filamentosos: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*) que em conjunto compreendem mais de 40 espécies, e são classificados conforme seu habitat natural e preferência por hospedeiro, podendo ser: antropofílicos, restritos a hospedeiros humanos; zoofílicos, que parasitam primariamente outros animais, mas que também podem ser patógenos humanos; ou geofílicos, cujo reservatório principal é o solo (ESCUTIA et al., 2001).

Do ponto de vista evolutivo, acredita-se que todos os dermatófitos foram originados no solo, local na qual possuíam hábito de vida sapróbio e, em determinado momento, passaram a degradar a queratina presente no solo e provenientes de animais (ROCHA & VIEIRA, 2014). Desde então, esses fungos adquiriram a capacidade de parasitar esses animais, adaptando-se à sua pele e pelos, originando primariamente, os fungos zoofílicos cujo parasitismo possibilitou uma nova adaptação, originando as espécies antropofílicas como *T. rubrum* (RIPPON, 1988; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

3.2.5. *Fusarium graminearum*

Os fungos pertencentes ao Gênero *Fusarium* são organismos cosmopolitas cuja forma de dispersão representa o principal fator para seu desenvolvimento. Essa dispersão pode ocorrer de diversas maneiras, seja por meio de materiais propagativos como rizomas e mudas (STOVER, 1962) ao manejo de equipamentos e ferramentas contaminados (PLOETZ, 2015). Sua distribuição pode estar diretamente relacionada ao tipo de clima, vegetação, solo e nutrientes do ambiente na qual se encontram (SOUSA, 2017). Apesar de serem mais facilmente encontrados em regiões com clima temperado e tropical, existem relatos de espécies do Gênero *Fusarium* em regiões árticas e desérticas, em associações subterrâneas e aéreas com a vegetação (SUMMERELL et al., 2010).

As colônias apresentam crescimento rápido e micélios aéreos com ramificações (MACIEL, 2012; FRIAS, 2014). São comumente encontrados no solo de regiões cujas condições sejam favoráveis para seu desenvolvimento, como as

regiões temperadas e tropicais (GUARRO, 2013). Espécies do Gênero *Fusarium* são resistentes e capazes de sobreviver durante muito tempo na ausência de um hospedeiro por meio de estruturas denominadas clamidósporos, associados a raízes e tecidos vasculares vegetais não hospedeiros (ROLIM, 2019).

A importância deste fungo reside no fato de a maioria das espécies do gênero serem fitopatógenos (GUARRO, 2013) cujas micotoxinas são nocivas às plantas colonizadas (NELSON et al., 1983), causando um imenso prejuízo aos agricultores; por esta razão, *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum* são apontados entre os dez patógenos economicamente relevantes (DEAN et al., 2012). Devido às micotoxinas extremamente tóxicas que produzem, a espécie *Fusarium graminearum* é conhecida por causar a fusariose, ou giberela, em plantios de trigo. Essas toxinas são acumuladas nos grãos e representam elevada toxicidade aos seres humanos e outros animais (GOSWAMI & KISTLER, 2004).

No Brasil a fusariose vem sendo monitorada há mais de três décadas, estudos recentes apontam que a doença atingiu uma frequência muito maior em regiões tritícolas, especialmente ao Sul do Brasil (REIS et al., 1996; LUZ, 2003; PANISSON et al., 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local de coleta e amostragem

Partindo do pressuposto de que as comunidades microbianas se distribuem no ambiente conforme suas propriedades físico-químicas (pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio e salinidade) e biológicas (interações ecológicas com os demais organismos), amostras de água foram coletadas em duplicata em diferentes pontos do lago de Itaipu (Figura 4), na região relacionada ao RBSH.

Desta forma, os locais de coleta incluíram: o canal do lago (S 24°51.194' W 54°21.244', longe das macrófitas), região das macrófitas (Ponto 2, S 24°51.234' W 54°23.009', entre as macrófitas) e a borda do lago (ponto 3), evidenciada com mais detalhes na Figura 5.



Figura 4 - Pontos de coleta das amostras de água, no Lago de Itaipu (RBSH). Ponto 1: Canal do Lago; 2: Região de Macrófitas; Região 3: Borda do Lago. Fonte: Autoria própria (2019).



Figura 5 - Borda do Lago de Itaipu e região de macrófitas, ao fundo, ambos locais de coleta das amostras de água. Fonte: Autoria própria (2019).

Com o intuito de garantir o acesso ao maior número possível de microrganismos, foram coletadas amostras em diferentes profundidades da coluna d'água (superfície, meio e fundo). As garrafas (Figura 5) utilizadas para armazenamento da água coletada foram previamente esterilizadas por autoclavagem, e abertas apenas no momento da coleta.



Figura 6 - Garrafas utilizadas para o armazenamento da água coletada.
Fonte: Autoria própria (2019).

Em razão de seu caráter preliminar e também pelo fato de as variações sazonais das comunidades do Lago de Itaipu não representarem o objetivo desta pesquisa, as coletas não ocorreram de forma periódica.

4.2. Obtenção dos isolados microbianos

Para a obtenção de actinobactérias foi utilizado o meio de cultivo Actinomycete Isolation Agar (HIMEDIA), suplementado com 0,5% de glicerol (utilizado como fonte de carbono pelas bactérias). A salinidade do meio foi ajustada de acordo com o grupo microbiano a ser isolado, e, pelo fato de o microrganismo de interesse ser um extremófilo halófilo, foram adicionadas crescentes concentrações de NaCl (5%, 7%, 10%) ao meio, em pH neutro.

Duas alíquotas de 100 μ L foram retiradas de cada amostra do lago, e foram posteriormente espalhadas sobre as placas de Petri contendo os meios de cultivo, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Cada placa foi semeada em duplicata. Após a semeadura, todas foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 28°C durante

um período total de 14 dias, período mínimo constatado para o desenvolvimento total das colônias halotolerantes.

4.3. Testes antimicrobianos

Para realizar a detecção da atividade antimicrobiana das actinobactérias obtidas, os isolados foram submetidos a dois testes distintos: antagonismo por difusão em ágar e por crescimento radial. Para ambos os testes antimicrobianos foram utilizados oito microrganismos com importância clínica e econômica nos dois protocolos, sendo quatro leveduras, duas bactérias e dois fungos filamentosos, listados no Quadro 4.

Quadro 3 - Cepas de microrganismos patogênicos utilizados nos testes de antagonismo, sua origem e meios de cultivo utilizados.

Cepas	Origem	Meios de Cultivo
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	Cepa padrão	Ágar Sabouraud
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 28707)	Cepa padrão	Ágar Sabouraud
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	Cepa padrão	Ágar Sabouraud
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	Cepa padrão	Ágar Nutriente
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 06633)	Cepa padrão	Ágar Nutriente
<i>Trichophyton rubrum</i> (ATCC 28189)	Cepa padrão	Ágar Batata-Dextrose
<i>Rhodotorula</i> sp. (UFPR Palotina)	Isolado	Ágar Sabouraud
<i>Fusarium graminearum</i> (UFPR Palotina)	Isolado	Ágar Batata-Dextrose

FONTE: Autoria própria (2019).

Os microrganismos foram mantidos em condições apropriadas, e submetidos a repiques constantes, nos meios de cultivo Ágar Nutriente (KASVI) para as bactérias, Ágar Sabouraud (KASVI) para as leveduras e Ágar Batata-Dextrose (KASVI) para os fungos filamentosos.

4.3.2. Teste por difusão em ágar

As leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Rhodotorula* sp. foram pré cultivadas em caldo Sabouraud, e incubadas a 37°C por 48h, com exceção de *Rhodotorula* sp., cuja temperatura máxima suportada para incubação é de 28°C. As bactérias *B. subtilis* e *B. cereus* foram cultivadas em caldo nutriente, e

incubadas a 28°C por 48h. Após a incubação, todos os microrganismos-teste foram diluídos em água destilada esterilizada segundo a escala 1 de McFarland, correspondendo à aproximadamente 3×10^8 células/mL.

Os microrganismos diluídos foram semeados em toda a superfície do meio sólido, em placas, com o auxílio de um swab de algodão estéril. Quanto aos nove isolados obtidos das amostras de água, estes, foram cultivados previamente em meio líquido seguindo a formulação ISP-4, descrita por Pereira et al. (2013), e posteriormente submetidos a incubação a 28°C por 7 dias. Após este período, alíquotas de 20 µL do sobrenadante dos isolados das amostras de água foram inseridas em poços com cerca de 12mm de diâmetro perfurados no ágar na qual os microrganismos-teste foram previamente semeados.

Segundo Barry & Thornsberry (1991), a avaliação deve ser realizada por meio de uma comparação com um padrão de referência (controle). Como controle positivo, geralmente emprega-se o quimioterápico em questão, e como controle negativo o próprio solvente utilizado para a dissolução do antagonista (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003). Desta forma, neste experimento, uma alíquota do meio de cultivo ISP-4 estéril foi utilizada como controle negativo. As placas foram incubadas por 48h de acordo com a temperatura ideal de incubação de cada microrganismo (28°C para *Rhodotorula* e 37°C para as demais leveduras e bactérias). A inibição pôde ser visualizada através da formação de um halo ao redor do poço.

4.3.3. Teste por crescimento radial

Os fungos filamentosos *F. graminearum* e *T. rubrum* foram semeados no centro de placas contendo meio sólido batata-dextrose (PDA marca). Em seguida, os nove isolados obtidos da água do lago foram semeados de modo pontual, próximos à borda da placa (SHAHIDI BONJAR, 2005). Após 7 dias de incubação a 28°C, os isolados foram observados quanto à produção de substâncias inibidoras através da inibição de crescimento radial do fungo-teste.

Teste antimicrobiano por crescimento radial

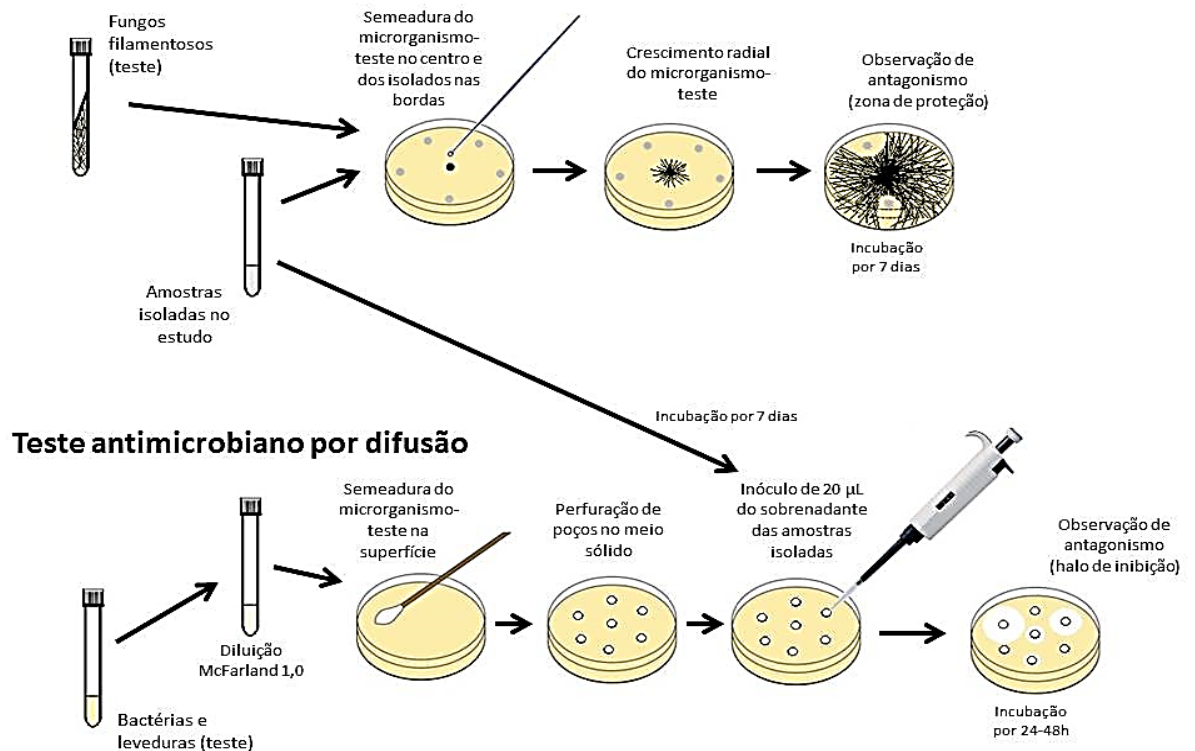


Figura 7 - Esquemática dos dois testes antimicrobianos realizados.
 FONTE: Autoria própria, 2019.

5 RESULTADOS

5.1 Isolados microbianos

O maior número de isolados foi proveniente das coletas da borda do lago, seguida pelos bancos de macrófitas. As amostras de água coletadas do canal resultaram em poucos isolados, provavelmente devido à maior incidência solar e pouco sedimento em suspensão.

Foram obtidos nove isolados que cresceram sob pressão osmótica por NaCl, considerados halotolerantes e denominados como isolados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Não foi obtido nenhum isolado halófilo extremo ou mesmo halófilo moderado, mesmo em amostras de água de diferentes pontos de coleta, indicando que a altura da coluna d'água, incidência de luz ou proximidade ao sedimento não influenciou na detecção de uma população microbiana advinda de nichos com características mais extremas.

Os isolados halotolerantes não foram capazes de crescer na concentração de 10% de NaCl, crescendo somente até 7%. Em relação aos morfotipos dos isolados, foi possível observar que absolutamente nenhum dos microrganismos halófilos produziu pigmentos nas condições metodológicas avaliadas (Figura 8). Além disso, necessitaram de um período relativamente mais longo de incubação para que conseguissem se desenvolver.

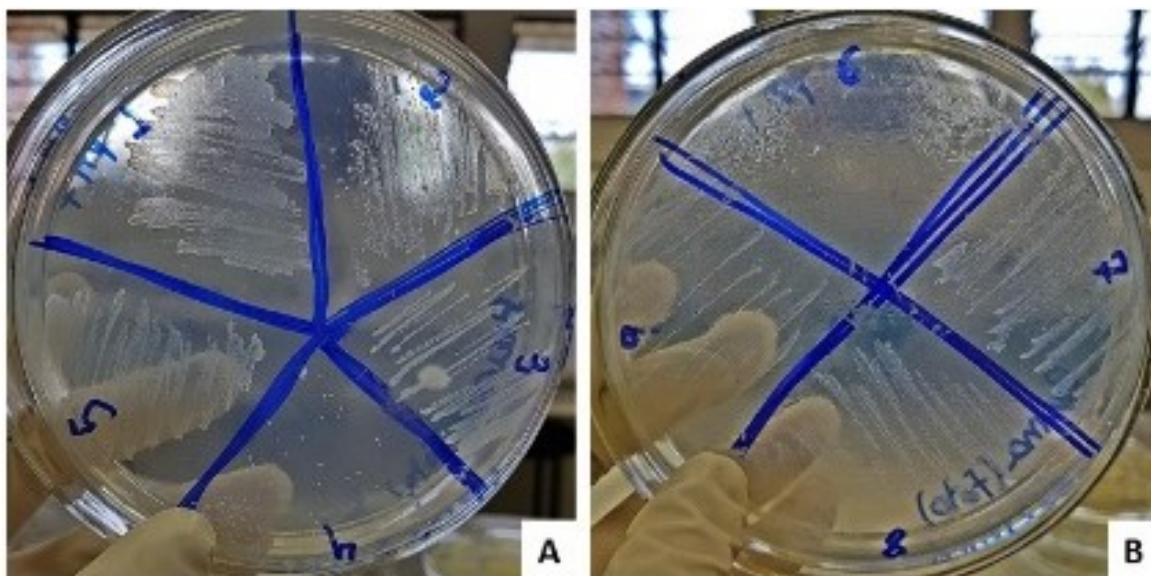


Figura 8 - Morfotipos dos nove microrganismos isolados da água do lago. A: Isolados de 1 a 5; B: Isolados de 6 a 9. FONTE: Autoria própria.

5.2 Teste de difusão em ágar

Com relação à atividade antimicrobiana, dentre todos os microrganismos testados, observou-se atividade de inibição contra *B. cereus* pelos halotolerantes 1, 3, 5 e 7 (Quadro 3).

5.3 Teste de crescimento radial

A técnica de crescimento radial aplicada para avaliar a inibição dos fungos filamentosos, frente aos isolados, não apresentou um padrão típico de halo como costuma ser visualizado na técnica de difusão em ágar, a partir de um poço. Deste modo não houve uma determinação em milímetros do diâmetro, como na outra técnica, pois a zona de inibição tende a ser de formato irregular. Entretanto, somente foi considerado resultado positivo quando o isolado conseguiu formar uma zona de proteção ao redor que impedisse a expansão micelial do fungo teste. Os testes realizados contra *T. rubrum* demonstraram que apenas o isolado halotolerante 9 apresentou propriedades inibidoras. Contra *F. graminearum*, observou-se um total

de cinco isolados antagônicos, sendo eles os quatro halotolerantes: 1, 2, 3 e 5 (Quadro 4).

Quadro 4 - Antagonismo total (representado pelo “x”, quando detectado). Nas linhas, os microrganismos confrontados. Nas colunas, os isolados halotolerantes testados.

Microrganismos confrontados	Isolados halotolerantes								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>B. cereus</i>	X		X		X		X		
<i>B. subtilis</i>									
<i>C. albicans</i>									
<i>C. parapsilosis</i>									
<i>C. tropicalis</i>									
<i>F. graminearum</i>	X	X	X		X				
<i>Rhodotorula sp.</i>									
<i>T. rubrum</i>									X

FONTE: Autoria Própria (2019).

Em ambos os testes (difusão em ágar e crescimento radial), 6 dentre os 9 isolados halotolerantes (aproximadamente 67% deles) demonstraram antagonismo *in vitro* contra ao menos um dos microrganismos testados.

6 DISCUSSÃO

As actinobactérias são Gram positivas, e o meio de cultivo específico utilizado visava a isolar de modo mais seletivo este grupo microbiano. De todo modo, não se pode afirmar que todos os isolados são actinobactérias, mesmo tendo sido utilizado um meio de cultivo específico, pois seria necessária também a realização de microcultivos para observação da formação filamentosa e reprodutiva, ou então, sequenciamento de regiões conservadas, porém ambas as situações não puderam

ser realizadas dentro do prazo deste trabalho. Os isolados foram avaliados quanto a sua resposta à coloração de Gram, e todos se apresentaram como Gram positivos. Todavia, diversas colônias formadas pelos isolados obtidos apresentaram crescimento característico e típico de actinobactérias: crescimento lento, formas irregulares, superfícies rugosas ou secas e de aspecto pulverulento.

Pelo fato de desempenharem funções fundamentais, como a ciclagem de compostos orgânicos e atuarem diretamente nos ciclos biogeoquímicos para a manutenção de ambientes como o Lago de Itaipu, as actinobactérias, microrganismos tipicamente associados ao solo, são frequentemente encontradas em lagos de água doce, especialmente nas regiões de transição entre o ambiente terrestre e o aquático, como as bordas do lago (ICHIWAKI, 2017). Principalmente por esta razão, acredita-se que um maior número de isolados pôde ser obtido nesta região.

Pesquisas demonstraram que as comunidades microbianas apresentam elevada sensibilidade a mudanças físicas e químicas que ocorrem no solo desses ecossistemas (RAMSEY et al., 2005; GIBBONS et al., 2014), tais como a ação de poluentes, excesso de matéria orgânica ou mesmo a inserção de microrganismos que não são nativos do ambiente; tais fatores podem afetar drasticamente as populações microbianas presentes na coluna d'água e no sedimento (STALEY et al., 2013). Sendo assim, as actinobactérias atuam ainda, como bioindicadores de degradação ambiental.

Os isolados foram classificados como halotolerantes pelo fato de apresentarem crescimento em maior número nos meios não salinos (CARRO et al., 2013), além de o local de coleta caracterizar-se como um ambiente aquático dulcícola. Por esta razão, nenhum isolado foi capaz de se estabelecer em meios com concentração de NaCl superiores a 7%, nas condições testadas.

Em relação à falta de pigmentação das colônias, acredita-se que, pelo fato de nenhum dos isolados da amostragem em questão apresentarem morfotipos pigmentados, o meio de cultivo salino possa ter restringido apenas isolados incolores. Amal et al. (2011), destacaram em sua pesquisa que a produção de pigmentos pelas colônias é sim, influenciada por fatores do meio como pH, salinidade, fonte de carbono disponível e temperatura. Todavia, Amsaveni et al. (2015), ao isolarem actinobactérias em diversas regiões da Índia, apontaram a

predominância de pigmentos amarelos e marrons. Por outro lado, Augustine et al. (2013) relataram a predominância da pigmentação branca, cinza e amarela em cepas de actinobactérias isoladas de sedimentos marinhos do Mar Árabe e da Baía de Bengala. Por esta razão, não podemos afirmar que em novas coletas realizadas na região ou ainda, em outros meios de cultivo, nenhum dos isolados apresentaria pigmentação.

O antagonismo detectado neste estudo mostra que o oeste do Paraná é uma região promissora para a busca de novas moléculas com atividades biológicas diversas, e embora seja uma região de fácil acesso, são escassos os estudos que visam a explorar o potencial biotecnológico de macro e microrganismos ali presentes. Este estudo, por exemplo, se mostrou promissor uma vez que *T. rubrum* é o principal causador de micose de unha e pé-de-atleta, e novas moléculas que possam inibir seu crescimento poderiam contribuir para um novo tratamento mais eficaz que os convencionais. *B. cereus*, por sua vez, é um conhecido contaminante de alimentos, especialmente laticínios, e um dos principais causadores de intoxicação alimentar. O estudo de substâncias inibidoras contra microrganismos contaminantes de alimentos pode levar a descoberta de novos conservantes alimentares. Por fim, as moléculas bioativas que promoveram a antibiose do *F. graminearum*, fungo causador de patologias em cultivos como trigo, podem ser aplicadas no controle do fungo em plantações, evitando grandes perdas econômicas aos produtores.

A avaliação da atividade antimicrobiana deste trabalho foi realizada em meios de cultivo conhecidamente nutritivos e que são capazes de sustentar o metabolismo ativo microbiano por vários dias, em condições normais de cultivo. Deste modo podemos afirmar que a inibição visualizada é provavelmente decorrente da presença de substâncias inibidoras produzidas pelos isolados e não por stress nutricional, como considerado por Alves (2007).

Outro fator importante para observar é que no presente estudo foram utilizados microrganismos e técnicas compatíveis com o tempo de crescimento. Na técnica de difusão em ágar, os microrganismos-teste possuem tempo de crescimento mais rápido comparado aos isolados, o que favorece sua expansão. Deste modo não ocorre o favorecimento de crescimento do isolado, o que poderia levar a uma interpretação equivocada da inibição frente ao microrganismo

patogênico testado, como considerado por Sharma et al. (2009). Do mesmo modo, na técnica de crescimento radial, devido ao fato dos fungos filamentosos patogênicos apresentarem tempo de crescimento lento, o inóculo central afastado dos isolados posicionados nas laterais, oferece o devido prazo de crescimento e expansão micelial, enquanto que os isolados, também de crescimento lento, se desenvolvem e supostamente produzem substâncias inibidoras para proteção de seu espaço nas bordas da placa.

Ainda sobre a atividade antagonista, os isolados halotolerantes 1,3 e 5 se mostraram eficazes contra todos os patógenos testados, Kommedahl & Windels (1978) enfatizam a importância de um antagonista ser efetivo contra vários patógenos. De acordo com Kupper et al. (2003), bactérias antagonistas, como as actinobactérias, geralmente agem de maneira mais significativa por meio do mecanismo de antibiose e, esporadicamente, por parasitismo e competição. Os microrganismos que agem por antibiose, geralmente apresentam amplo espectro de ação (KUPPER et al., 2003), corroborando os resultados obtidos.

7 CONCLUSÕES

A partir deste estudo e do próprio levantamento bibliográfico realizado antes da execução do mesmo, foi possível concluir que a descoberta de novas moléculas bioativas depende de exaustivos testes para a triagem da diversidade microbiana presente nos mais variados ambientes. Além disso, esta pesquisa demonstrou que o Lago de Itaipu, receptor da água de rios que drenam parte do oeste do país, ainda permanece pouco estudado neste sentido. Ele apresentou elevado potencial biotecnológico, demonstrado neste estudo por meio da quantidade de isolados promissores no que diz respeito à produção de moléculas de interesse.

Entretanto, apesar de os isolados halotolerantes encontrados expressarem características bastante positivas em relação à atividade antagonista frente aos microrganismos patogênicos testados durante este estudo, ainda são necessárias maiores investigações a respeito de sua identificação, das moléculas bioativas sintetizadas e também a respeito da interferência e influência de fatores externos como a sazonalidade, as propriedades físico-químicas da água e as interações com outras populações sobre os mecanismos fisiológicos destes microrganismos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram evidenciadas algumas questões importantes relativas à comunidade microbiana da região, visto que, além da presença de bactérias halotolerantes em um ambiente aquático dulcícola, este estudo também demonstrou que a frequência dos microrganismos varia entre os diferentes pontos de coleta no Lago.

Esta variação nos aponta algumas questões interessantes, como a preferência destes microrganismos por locais com menor incidência solar, maior disponibilidade de oxigênio e maior quantidade de sedimentos em suspensão, como a borda do Lago. Eles também se revelaram bastante presentes na região dos bancos de macrófitas, sugerindo uma possível interação ecológica mutualista entre as comunidades lá estabelecidas.

Além de sua importância ecológica para a manutenção deste ecossistema, esses microrganismos também representam uma fração relevante dentre os inúmeros recursos naturais que a região provém para a realização de atividades de interesse comercial, como a bioprospecção, devido às suas propriedades naturais.

Finalmente, em razão do prazo, esta pesquisa deverá ser retomada para a identificação dos isolados que apresentaram antagonismo, bem como das possíveis moléculas bioativas de interesse.

REFERÊNCIAS

- AGHAMIRIAM, M. R.; GHISIAN, S. A. Isolation and characterization of medically important aerobic actinomycetes in soil of iran (2006-2007). **Open Microbiology Journal**, v.3, p.53, 2009.
- ALTUN, H. U. et al. A case of onychomycosis caused by *Rhodotorula glutinis*. **Case reports in dermatological medicine**, v. 2014, 2014.
- ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- ALVES, M. L. N. **Avaliação do potencial de leveduras dos gêneros Pseudozyma e Rhodosporidium no controle biológico pós-colheita de bolores**. 2007. Tese de Doutorado.
- AMAL, A. M. et al. Selection of Pigment (Melanin) production in Streptomyces and their application in Printing and Dyeing of Wool Fabrics. **Research Journal of Chemical Sciences** ISSN, v. 2231, p. 606X, 2011.
- AMSAVENI, R. et al. Screening and isolation of pigment producing Actinomycetes from soil samples. **International Journal of Biosciences and Nanosciences**, v. 2, n. 2, p. 24-28, 2015.
- AUGUSTINE, D. et al. Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal: biochemical and physiological characterization. **International Journal of Research in Marine Sciences**, v. 2, p. 56-63, 2013.
- BARRY, A.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS A., HAUSER W. J., HERMANN K.L., ISENBERG, H.D., SHAMODY H. J. 1991. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125.
- BATT, C. A. *Bacillus cereus*. In: **Encyclopedia of food microbiology**. Academic Press San Diego, CA, 2000. p. 119-149.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1, 2005.
- BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2007.
- BRASIL, **Medida Provisória n. 2.186-16/2001**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/2186-16.htm>. Acesso em: 12 set. 2019.

BULL, A.T. et al. (Ed.). **Microbial diversity and bioprospecting**. Washington, DC: ASM press, 2004.

CARDOSO, T. S. **Papel do ATP na infecção de Macrófagos por *Candida albicans***. 2013. Dissertação de Mestrado.

CARRO, L. et al. *Micromonospora halotolerans* sp. nov., isolated from the rhizosphere of a *Pisum sativum* plant. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 6, p. 1245-1254, 2013.

CHAUDHARY, H.S. et al. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 8, p. S83-S94, 2013.

CHIMELLI, P. A. V. et al. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 259-263, 2003.

COLEMAN, D. C. et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology**, v. 36, p. 156-165, 1998.

COOPER JR, C. R. Yeasts pathogenic to humans. In: **the yeasts**. Elsevier, 2011. p. 9-19.

COUTINHO, L. **Biomass brasileiros**. Oficina de Textos, 2016.

COUTINHO, T. J. D. et al. Análise evolutiva das subunidades ligadoras de substrato presentes no sistema de osmoproteção em procariotos. 2012.

CRAWFORD, D. L. et al. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3899-3905, 1993.

CUNHA, J. E. Caracterização Físico Espacial da Bacia Hidrográfica do Paraná 3. In: ROCHA, A. S.; BADE, M. R. Geografia da bacia hidrográfica do Paraná 3: fragilidades e potencialidades socioambientais. Jundiaí, SP: Ed. In house, 2018. 314 p.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5, 2009.

DI PINTO, A. et al. Occurrence of potentially enterotoxigenic *Bacillus cereus* in infant milk powder. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 2, p. 275-279, 2013.

DODD, M. S. et al. Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates. **Nature**, v. 543, n. 7643, p. 60, 2017.

DUARTE, R. T. D.; LIMA, I. G. P. Astrobiologia: O Estudo da Origem e Evolução da Vida no Univers. **Revista Macrocosmo.com**. ano II. Edição num 13, 2004.

DUBOC DE ALMEIDA, G. M. et al. *Rhodotorula spp.* isolated from blood cultures: clinical and microbiological aspects. **Sabouraudia**, v. 46, n. 6, p. 547-556, 2008.

ENSIGN, J.C. Formation, properties, and germination of actinomycetes spores. **Annual Reviews in Microbiology**, Boston, v.32, n.1, p.185-219, 1978.

ESCUDEIRO, E. L. R.; DAZA, O. D. S.; TORRES, J. H. Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella sp* y *Cellulosimicrobium sp*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 14, n. 2, p. 70-80, 2012.

ESCUTIA, B. et al. Tinea capitis by *Microsporum audouinii*. **Revista iberoamericana de micología**, v. 18, n. 2, p. 88-90, 2001.

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

FRANÇA, A.G. **Filo Actinobacteria e abundância do gene alkB em solos rizosféricos cultivados sob sistemas de colheita de cana-de-açúcar**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FREITAS, B. de; PIRES, DVD da CP. Fatores de risco associados à candidíase vulvovaginal. **Revista Eletrônica Saúde em Foco**, v. 8, p. 247-252, 2016.

FRIAS, A. G. **Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* e f. sp. lactucae obtidos de campos de produção comercial no estado de São Paulo e avaliação de genótipos de alface**. 2014. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Agronomia) –Botucatu–SP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, P 56.

GAARDER, J. **Sofies verden**. 1991.

GAMALETSOU, M. N.; WALSH, T. J.; SIPSAS, N. V. Invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: emergence of resistant pathogens and new antifungal therapies. **Turkish Journal of Hematology**, v. 35, n. 1, p. 1, 2018.

GAO, B.; PARAMANATHAN, R.; GUPTA, R. S. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 1, p. 69-91, 2006.

GARCÍA-SUÁREZ, J. et al. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* infection in haematological patients. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. 318-324, 2011.

GAVA, C. A. T. et al. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1373-1380, 2002.

GIBBONS, S.M. et al. Human and environmental impacts on river sediment microbial communities. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e97435, 2014.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOCHNAUER, M. B. et al. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. **Canadian journal of microbiology**, v. 21, n. 10, p. 1500-1511, 1975.

GOLINSKA, P.; WYPIJ, M.; AGARKAR, G.; RATHOD, D.; DAHM, H.; RAI, M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 2, p. 267-289, 2015.

GOSWAMI, R. S.; KISTLER, H. C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular plant pathology**, v. 5, n. 6, p. 515-525, 2004.

GOYAL, R. et al. *Rhodotorula mucilaginosa* as a cause of persistent femoral nonunion. **Journal of postgraduate medicine**, v. 54, n. 1, p. 25, 2008.

GRAY, T. R. G.; WILLIAMS, S. T. Soil micro-organisms. **Soil micro-organisms**. 1971.

GUARRO, J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. Euro. **Journal of Clinical Microbiology**. Infect. Dis. p. 32, 2013.

HAGAN, M. E. et al. A pseudoepidemic of *Rhodotorula rubra*: a marker for microbial contamination of the bronchoscope. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 16, n. 12, p. 727-728, 1995.

HAHN, C.T. **Produção e consumo do espaço urbano de Foz do Iguaçu**. 2006. 215f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Aquidauana, MS: UFMS, 2006.

HASANI, A; KARIMINIK, A.; ISSAZADEH, K. Streptomycetes: Characteristics and their antimicrobial activities. v.2, n.1, p. 63-75, 2014.

ICHIWAKI, S. **Caracterização e identificação de linhagens de actinomicetos isoladas de amostras de água e sedimento da bacia do rio Tietê**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ITAIPU BINACIONAL. **A vila C, um dos bairros mais populosos de Foz do Iguaçu, surgiu por iniciativa da Itaipu**. Disponível em: <<https://www.itaipu.gov.br/responsabilidade/energia-solidaria>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 231-235, 2003.

KAUR, R. et al. Identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* species: a comparison of Vitek-2 system with conventional and molecular methods. **Journal of global infectious diseases**, v. 8, n. 4, p. 139, 2016.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. In: **Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes**. Elsevier, 1999. p. 65-76.

KOMMEDAHL, T.; WINDELS, C. E. Evaluation of biological seed treatment for controlling root diseases of pea. **Phytopathology**, v. 68, n. 7, 1978.

KRZYŚCIAK, P. et al. Drug susceptibility of 64 strains of *Rhodotorula sp.* **Wiad Parazytol**, v. 56, n. 2, p. 167-170, 2010.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, v. 69, p. 20-29, 2016.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia brasileira**, p. 251-257, 2003.

KUSTER, E. Taxonomy of soil actinomycetes and related organisms. **The Ecology of Soil Bacteria**. University of Toronto Press, Toronto, Canada, p. 322, 1968.

LACAZ, C. S. et al. Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico. 1998.

LACAZ, C.S. et al. Tratado de micologia médica Lacaz. 2002.

LECHEVALIER, M. P.; LECHEVALIER, H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 435-443, 1970.

LEVIN, A. S. et al. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 30, n. 4, p. 243-249, 1998.

LIMBERGER, S. **Microalgas perifíticas como bioindicadores ambientais na foz do Rio Ocoy: tributário do lago de Itaipu-PR**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

LO RE III, V.; FISHMAN, N. O.; NACHAMKIN, I. Recurrent catheter-related *Rhodotorula rubra* infection. **Clinical microbiology and infection**, v. 9, n. 8, p. 897-900, 2003.

LUZ, W. C. Manejo integrado de doenças de trigo no século XXI. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. S101-S109, 2003.

MACIEL, C. G. et al. *Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle. 2012.

- MADIGAN, M. T., et al. **Microbiologia de Brock** - 14ª Edição. Artmed Editora, 2016.
- MARCON, T. R.; TEMPONI, L. G.; GRIS, D.; FORTES, A. M. T. Guia ilustrado de *Leguminosae Juss.* Arbóreas do Corredor de Biodiversidade Santa Maria – PR. **Biota Neotropica** v. 13, p. 350-373, 2010.
- MARCONI, C. ***Pseudomonas aeruginosa* na otite externa em animais de companhia: resistência aos antimicrobianos.** 2019. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- MCCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review. **Gene**, v.115, n, 1-2, p. 189-92, 1992.
- MELLEGÅRD, H. et al. Inhibition of *Bacillus cereus* spore outgrowth and multiplication by chitosan. **International journal of food microbiology**, v. 149, n. 3, p. 218-225, 2011.
- MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 143-150, 2010.
- MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011.
- MIRANDA, M.B. A Empresa Binacional Itaipu. **Revista Virtual Direito Brasil**, v. 2, n. 2-2008, p. 1-30, 2008.
- MONCIARDINI, P.; IORIO, M.; MAFFIOLI, S.; SOSIO, M.; DONADIO, S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbiology Biotechnology**, v.7, p. 209–220, 2014.
- MORAIS, J. F. et al. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista UNINGÁ Review**, v. 17, n. 1, 2018.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2ed. Lavras: UFLA, 2006, 729 p.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. 1983.
- NETT, M.; IKEDA, H.; MOORE, B.S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. **Natural product reports**, v. 26, n. 11, p. 1362-1384, 2009.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OLIVEIRA, M. F. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. 2003.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PANISSON, E.; REIS, E. M.; BOLLER, W. Quantificação de danos causados pela giberela em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 189-192, 2003.

PASTOR, J. M. et al. Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 782-801, 2010.

PAUL, S. et al. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. **Genome biology**, v. 9, n. 4, p. R70, 2008.

PEIXOTO, J. V. et al. Candidíase: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.

PEREIRA NETO, J.T. **Tratamento e destinação de resíduos provenientes de empreendimentos agrícolas**. Viçosa: ABEAS – Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior. 1996. 77p.

PEREIRA, E.; SANTOS, A.; REIS, F.; TAVARES, R.M.; BAPTISTA, P.; LINO-NETO, T.; ALMEIDA-AGUIAR, C. A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. **Microbiological Research**, v. 168, p. 1–5, 2013.

PERETZ, A. et al. Tinea capitis-like infection caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in a shelter for African Refugee Children in Northern Israel. **Acta tropica**, v. 179, p. 44-46, 2018.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4419-4431, 2004.

PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt of banana. **Phytopathology**, v. 105, n. 12, p. 1512-1521, 2015.

POIATTI, M. L. **Características microbiológicas de diferentes leites caprinos**. 2005. 62f. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Zootecnia) –Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

QIN, S. et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

- RAMSEY, P. W. et al. Relationship between communities and processes; new insights from a field study of a contaminated ecosystem. **Ecology letters**, v. 8, n. 11, p. 1201-1210, 2005.
- REIS, E. M. et al. Grain losses caused by the infection of wheat heads by *Gibberella zeae* in southern Brazil, from 1984 to 1994. **Summa Phytopathologica**, v. 22, n. 2, 1996.
- REPONEN, T. A. et al. Characteristics of airborne actinomycete spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3807-3812, 1998.
- REZENDE, A. Bactérias Extremófilas Facultativas: efeito na promoção de crescimento de plantas de tomate e na supressão de *Ralstonia solanacearum*. 2010.
- RICHARDSON, J. P.; MOYES, D. L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 327-337, 2015.
- RIPPON, J. W. Zygomycosis. **Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**, p. 681-713, 1988.
- ROBINSON, R. K. **Encyclopedia of food microbiology**. Academic press, 2014.
- ROCHA, D.; VIEIRA, F. A. S. Levantamento epidemiológico de infecções fúngicas de pacientes atendidos em um laboratório da região do Vale dos Sinos, RS. **NewsLab: a revista do laboratório moderno**, v. 121, p. 100-108, 2014.
- RODRIGUES, K. **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos**. 2006.
- ROLIM, J. M. et al. Caracterização morfofisiológica e molecular de *Fusarium spp.*, agente causal da murcha em *Carya illinoensis* k. 2019.
- ROSAS RAMÍREZ, J. R.; RAMÍREZ DURÁN, N. Identificación de bacterias halófilas tolerantes a metales pesados. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidad Autónoma del Estado de México.
- ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1092, 2001.
- SAHA, R. et al. Microbial siderophores: A mini review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 4, p.303-317, 2013.
- SANTA HELENA. **Plano de Manejo do Refúgio Biológico de Santa Helena – Área de Relevante Interesse Ecológico – ARIE – SH**. Santa Helena, Nattual Engenharia Ambiental, 2010.
- SANTOS, H.; LAMOSA, P.; COSTA, M. Extremófilos: microrganismos à prova de agressões ambientais extremas. **Biociencia Microbiana: Boletim de Biociencia**, n. 2, 2001.
- SATYANARAYANA, T.; RAGHUKUMAR, C.; SHIVAJI, S. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. **Current science**, p. 78-90, 2005.

SEIFI, Z.; MAHMOUDABADI, A. Z.; HYDRINIA, S. Isolation, identification and susceptibility profile of *Rhodotorula* species isolated from two educational hospitals in Ahvaz. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 6, 2013.

SEMA – Secretaria de Estado do meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Bacias Hidrográficas do Paraná: Série Histórica**. Curitiba, 140p. 2010.

SETHIL-RAJAN, D. et al. Investigation on antimicrobial activity of root extracts of *Thespesia populnea* Linn. **Tropical biomedicine**, v. 30, n. 4, p. 570-578, 2013.

SHAHIDI BONJAR, G. H. et al. Antifungal characterization of actinomycetes isolated from Kerman, Iran and their future prospects in biological control strategies in greenhouse and field conditions. **Plant Pathology Journal**, v. 4, n. 1, p. 78-84, 2005.

SHARMA, R. R.; SINGH, Dinesh; SINGH, Rajbir. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological control**, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009.

SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n.2, p.285-295, 2003.

SILVA, J. F. M. et al. Contaminação por *Bacillus cereus* e os riscos de intoxicação alimentar. **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 5, n. 2, p. 30-40, 2018.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA, U.B. **Análise metagenômica da microbiota de ambientes aquáticos do estado do Rio Grande do Norte-Brasil**. 2013. 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

SILVA-LACERDA, G. R. et al. Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Genetics Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2016.

SINGH, D.P. et al. Actinomycetes as Potential Plant Growth-Promoting Microbial Communities. In: **Crop Improvement Through Microbial Biotechnology**. Elsevier, 2018. p. 27-38.

SIQUEIRA, A. B. S. et al. *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 1, p. 90-96, 2009.

SOUSA, R. R. Incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho e métodos de inoculação em diferentes genótipos e estágios fenológicos. 2017.

SOUZA, A.Q.L. et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SPRINGFIELD, E. P. et al. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 434-439, 2003.

STALEY, C. et al. Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 5, p. 1147-1158, 2013.

STOVER, R. H. et al. Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other *Musa* species. **Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species.**, 1962.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUMMERELL, B. A. et al. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**, v. 44, n. 1, p. 3-13, 2010.

TADEO, Xavier et al. Structural basis for the amino acid composition of proteins from halophilic archaea. **PLoS biology**, v. 7, n. 12, p. e1000257, 2009.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TANG, J. et al. High incidences of invasive fungal infections in acute myeloid leukemia patients receiving induction chemotherapy without systemic antifungal prophylaxis: a prospective observational study in Taiwan. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128410, 2015.

TEJERA-HERNÁNDEZ, B.; ROJAS-BADÍA, M. M.; HEYDRICH-PÉREZ, M. Potencialidades del género **Bacillus** en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 42, n. 3, p. 131-138, 2011.

TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* pathogenic species complex. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 9, p. a019778, 2014.

VARELLA, L. **Estudo químico e estratégias para modular o metabolismo secundário de actinobactérias endofíticas.** 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **RBAC**, v. 49, n. 3, p. 235-9, 2017.

WANG, E. et al. The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 8, p. 2362-2368, 2015.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

WINGARD, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clinical infectious diseases**, v. 20, n. 1, p. 115-125, 1995.

WIRTH, F. Infecção disseminada por *Rhodotorula* em um modelo experimental em ratos. 2011.

WIRTH, F.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2012, 2012.

YANCEY, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 15, p. 2819-2830, 2005.

YOSHIDA, M. et al. *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 15-20, 1991.

ZELAZOWSKI, V. H. Revegetalização do Refúgio Biológico de Santa Helena-PR, Itaipu Binacional. Santa Helena, Prefeitura Municipal, 1990.