



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS (SAM) POR ACTINOBACTERIAS ISOLADAS DE AMBIENTES BRASILEIROS

RANGEL R.R.¹, GOULART, F.R.V.², ALVIANO, C.S.², ALVIANO, D.S.² e NASCIMENTO, R.P.¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Laboratório de Ecologia e Processos Microbianos (LEPM)

² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia Geral

E-mail para contato: rodrigopires@eq.ufrj.br

RESUMO – As actinobactérias são bactérias filamentosas Gram-positivas com grande potencial na produção de diversos metabólitos, como enzimas, compostos antitumorais e compostos antimicrobianos. O desenvolvimento de estudos em bioprospecção é muito importante na busca de novas fontes potenciais para produção de substâncias com ação antimicrobiana (SAMs). Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial de diversas linhagens de actinobactérias isoladas de diferentes biomas brasileiros na produção de SAMs. Ao todo, 176 linhagens de actinobactérias foram testadas contra diferentes linhagens de bactérias teste (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* MRSA) e leveduras (*Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*) com relevância médica. As actinobactérias foram cultivadas em meio Ágar Muller-Hinton por 12 dias a 28°C e, após esse período, os microrganismos-teste foram inoculados pela técnica **cross-streak** (antibiose) e incubados a 35°C por 48 horas. A linhagem AM6-12 apresentou os melhores resultados no teste de antibiose e foi selecionada para produção da SAM por fermentação submersa. A linhagem foi inoculada em frasco cônico (1.000 mL) contendo glicerol-peptona, incubada a 28°C por 12 dias e após obtenção do sobrenadante, 3 concentrações diferentes (50, 100 e 150 µL) do extrato foram aplicados em discos de papel de filtro (Ø 5 mm). Os discos foram colocados na superfície do meio Ágar Muller-Hinton, inoculado com suspensão dos microrganismos-teste padronizada (0.5 escala McFarland) e incubados a 35°C por 36h. Após esse período, os halos de inibição foram medidos e o potencial de inibição determinado. Os maiores halos de inibição foram observados para o *S. aureus* MRSA (Ø 19 mm) e *P. aeruginosa* (Ø 10 mm). Assim, os resultados obtidos sugerem o potencial biotecnológico da linhagem AM6-12 para produção de SAMs por processo fermentativo.

1. INTRODUÇÃO

As actinobactérias compreendem bactérias Gram-positivas, aeróbias, anaeróbias facultativas ou anaeróbias estritas, quimiorganotróficas e mesofílicas (Goodfellow e Findley, 2010). As actinobactérias estão amplamente distribuídas em ambientes aquáticos e terrestres, incluindo ambientes extremos tais como sedimentos de águas profundas. Porém o principal reservatório das actinobactérias, em especial, gênero *Streptomyces*, é o solo, apresentando um



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo - SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo - SP

papel preponderante na reciclagem da matéria orgânica e de moléculas recalcitrantes (Jurelevicius et al., 2017). Devido a sua grande diversidade metabólica, as actinobactérias do gênero *Streptomyces* vêm sendo descritas como as principais produtores de antibióticos do solo e por isso são consideradas um dos mais importantes microrganismos do ponto de vista industrial. Após os antibióticos, as enzimas são os compostos mais importantes produzidos pelas actinobactérias. A vantagem da utilização de actinobactérias na produção de enzimas em substituição as tradicionais fontes animais e vegetais, diz respeito ao rendimento relativamente alto, eficiência de custos e susceptibilidade a manipulação genética. Esses microrganismos são capazes de produzir enzimas de interesse médico, como as asparaginases e proteases; comercial, como celulases e queratinases; e ambiental, como as lipases, quitinases e lignina peroxidases (Jurelevicius et al., 2017).

Estudar actinobactérias é de grande relevância biotecnológica, em especial nos diferentes biomas brasileiros. Assim o presente trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano de diferentes linhagens de actinobactérias isoladas de solo de Cerrado, Mata Atlântica e Ambiente Costeiro (manguezal e restinga) contra bactérias e fungos de importância médica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. 1. Manutenção das Actinobactérias e Ensaio de Antibiose

As linhagens de actinobactérias (176) isoladas de diferentes biomas brasileiros (Cerrado, Mata Atlântica e Ambientes Costeiros) foram cultivadas inicialmente em meio Agar ISP-2 e incubadas a 28°C por 10 dias para obtenção de biomassa (Pridham et al., 1956-57). Após esse período as linhagens foram transferidas com auxílio de uma alça de platina para outra placa contendo meio Agar Muller-Hinton, sendo, o inóculo, realizado na forma de uma estria central (Figura 1) e o sistema incubado a 28°C / 12 dias. Após esse período os microrganismos-testes (*Staphylococcus aureus* MRSA BMB9393, *Pseudomonas aeruginosas* ATCC9027, *Escherichia coli* ATCC11229, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Cryptococcus neoformans* T1444) foram inoculados através da técnica *cross-streak* (Figura 1), e então incubados a 35°C / 48 horas (bactérias) e 120 horas (fungos). As placas contendo crescimento dos microrganismos-testes, sem a presença das actinobactérias, foram utilizadas como controle. As linhagens consideradas promissoras foram selecionadas para etapa posterior.

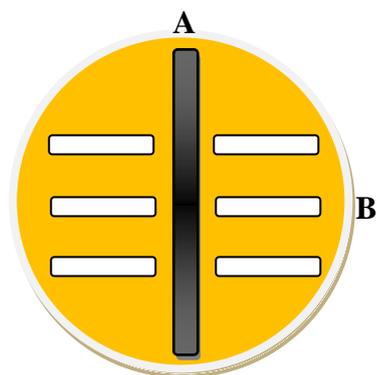


Figura 1 – Ilustração esquemática da forma de inoculação em *cross-streak*. (A) actinobacteria; (B) microrganismos-teste



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo - SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo - SP

2.2. Produção do Extrato e Antibiograma

Após avaliação do potencial antimicrobiano das actinobactérias pela técnica *cross-streak*, a linhagem considerada promissora foi cultivada em meio agar ISP-2 a 28°C / 10 dias, sendo então transferidas, na forma de 2 *slots* (1 cm²) para frascos cônicos (1.000 mL) contendo 200 mL de meio glicerol peptona (pH 6.5) e incubados a 180 rpm / 28°C / 12 dias (Sacramento, 2004). Após esse período, a biomassa microbiana foi separada do sobrenadante por filtração a vácuo utilizando papel de filtro (0,45 µm) e o sobrenadante conservado sob refrigeração (4°C), para as análises posteriores.

Para a realização do ensaio de antibiograma, diferentes concentrações de sobrenadante (50, 100 e 150 µL) foram aplicadas em discos de papel de filtro Whatman (Ø 0,5 cm). Primeiramente, as placas de Petri contendo Agar Muller-Hinton (20 mL) foram inoculadas com os diferentes microrganismos-testes (Bactérias: *P. aeruginosas* ATCC9027, *E. coli* ATCC11229, *S. aureus* MRSA BMB9393; Leveduras: *C. albicans* ATCC 10231 e *C. neoformans* T1444), de forma padronizada (0,5 escala de McFarland), pela técnica do *spread plate*, com auxílio de *swabb* estéril. Após o inóculo, os discos contendo as diferentes concentrações do sobrenadante da cultura da linhagem AM6-12 foram colocados gentilmente na superfície do meio de cultura e o sistema incubado a 35°C / 36 h. A verificação das zonas de inibição foi realizada medindo-se o diâmetro total da área sem crescimento microbiano (Barry e Thornsberry, 1991).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 176 linhagens de actinobactérias testadas no presente trabalho fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Ecologia e Processos Microbianos da Escola de Química, UFRJ. As linhagens foram isoladas de diferentes biomas brasileiros. Apenas 2 linhagens (AM6-12 e CDPI-73B) foram capazes de inibir 100% (zona de inibição > 34 mm) o crescimento das bactérias *S. aureus* MRSA BMB9393, *E. coli* ATCC11229 e *P. aeruginosas* ATCC 9027 (Tabela 1), e cerca de 150 linhagens foram capazes de inibir o crescimento das leveduras *C. albicans* ATCC10231 e *C. neoformans* T1444. Kumar e Rao (2012) avaliaram o potencial antimicrobiano de 51 linhagens de actinobactérias, pela técnica de *cross-streak*, contra *S. aureus* MRSA, sendo 5 (SRB1, SRB20, SRB5, SRB32, SRB38) consideradas promissoras, apresentando zonas de inibição entre 4,7 e 18,1 mm. A linhagem AM6-12 foi avaliada quanto à produção das SAMs por processo fermentativo e subsequente avaliação do potencial de inibição pela técnica do antibiograma. Quando as bactérias-teste *S. aureus* MRSA BMB9393 e *P. aeruginosas* ATCC9027 foram expostas ao disco contendo 150 µL do sobrenadante obtido, foram observadas zonas de inibição de Ø 19,0 mm e Ø 10,0 mm, respectivamente, ao fim de 24 h / 35°C. Singh *et al.* (2012) apresentaram resultados positivos contra *S. aureus* MRSA (Ø 14,0 mm) e *E. coli* ATCC25922 (Ø 14,0 mm) quando se utilizou o sobrenadante obtido a partir da linhagem de actinobactéria MITS1005, isolada de solo de Gwalior / Índia.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

Tabela 1 – Relação das actinobactérias mais promissoras quanto à capacidade em inibir o crescimento de bactérias e leveduras teste

Linhas de Actinobactéria	<i>E.coli</i> ATCC11229	<i>S. aureus</i> MRSA BMB9393	<i>P. aeruginosas</i> ATCC 9027	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<i>C. neoformans</i> T1444
AM6-12	+++	+++	+++	+++	+++
AIM6-6	-	++	-	+++	+++
CDPI-78B	-	++	-	+++	+++
CDPI-73B	+++	+++	+++	+++	+++
CDCI-21A	-	++	-	+++	+++
CDCI-21B	-	++	-	+++	+++

(-) ausência de inibição; (+) inibição entre 10–15 mm; (++) inibição entre 15–34 mm; (+++) ausência de crescimento

4. CONCLUSÃO

As actinobactérias são amplamente conhecidas como as principais produtoras de compostos com ação antimicrobiana no ambiente. A linhagem AM6-12, isolada de ambiente costeiro, apresentou potencial antimicrobiano contra *S. aureus* MRSA, um patógeno de grande relevância médica, principalmente em ambientes hospitalares. Este resultado sugere seu potencial uso para fins biotecnológicos, em especial pela indústria farmacêutica.

5. REFERÊNCIAS

- ATTA, HOUSSAM M. Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 19, n. 1, p. 12-22, 2015.
- BARRY, A.L., THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS A, HAUSER WJ, HERMANN KL, ISENBERG HD, SHAMODY HJ 1991. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125, 1991.
- GOODFELLOW, M, FIEDLER, HP. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 98, pp.119–142, 2010.
- JURELEVICIUS, D.A., VOLLÚ, R.E.; NASCIMENTO, R.P., COELHO, R.R.R. Biologia e Biotecnologia de Procariotos. In: *Microbiologia Industrial*, volume 1, Ed. Elsevier. pp 61-136, 2017.
- KUMAR, S., RAO, K.V.B. In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, p. 787-792, 2012.
- PRIDHAM, T.G., LINDENFESLER, L.A. et al. Antibiotics against plant disease, I. Laboratory and green house survey. *Phytopathology*, v. 46, pp. 568-575, 1956.
- SACRAMENTO, D.R. COELHO, R.R.R. et al. Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, n. 3, p. 225-229, 2004.
- SINGH, S., KUMAR, P., GOPALAN, N., SHRIVASTAVA, B., KUHAD, R.C., CHAUDHARY, H.S. Isolation and partial characterization of actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 2012, p. S1147-S1150, 2012.

APOIO FINANCEIRO: CNPq