

Unidade X

Prospecção de bactérias produtoras de antibióticos

Margarida Casal, Dorit Schuller, Ana Ribeiro, Helena Cardoso e Alexandra Nobre

A origem do termo biotecnologia remonta a 1919, altura em que foi usado pelo engenheiro húngaro Karl Ereky, para designar todos os processos envolvidos na formação de produtos a partir de matéria prima utilizando a “ajuda” de organismos vivos. No entanto, apesar do termo biotecnologia ter apenas cerca de 100 anos, as suas raízes remontam a mais de 6000 anos atrás com a produção dos primeiros alimentos fermentados (pão, vinho, cerveja), biotecnologia clássica. Na sua forma mais pura, a biotecnologia consiste na “utilização de organismos vivos ou dos seus produtos para modificar a saúde e o ambiente humanos”. Até ao século XX, a utilização da biotecnologia resume-se em grande parte na aplicações à agricultura e melhoramento animal.

No início do século passado a biotecnologia começou a juntar a agricultura e a indústria, no sentido de utilizar os excedentes da primeira como matéria prima na formação de produtos de interesse (por exemplo, a produção de acetona-butanol a partir de amido durante a 1ª Grande Guerra). Posteriormente, com os trabalhos de Alexander Fleming e o advento da 2ª Guerra Mundial, o foco da biotecnologia moveu-se no sentido dos produtos farmacêuticos e culminou em 1942, na produção em massa do primeiro antibiótico, a penicilina. Este foi sem dúvida marco histórico das engenharias bioquímica e microbiana. Mais tarde, durante os anos da “guerra fria”, os trabalhos biotecnológicos foram dominados pela preparação de armas biológicas além do investimento na produção de novos antibióticos.

Com o aparecimento da tecnologia do DNA recombinante nos anos 70, surge a biotecnologia moderna e passa a ser possível manipular as características desejáveis dos seres vivos. Em 1982 é comercializado o primeiro produto desta tecnologia, a insulina humana produzida a partir de *Escherichia coli* transformada. A explosão das técnicas genéticas, levou nos nossos dias ao aparecimento de três grandes ramos: a engenharia genética, as técnicas de diagnóstico e as técnicas de cultura celular e de tecidos. Actualmente, a biotecnologia é usada em áreas tão diversas como a agricultura, o processamento de alimentos, a saúde, a produção de energia (regra dos 5 F's “Food, Fuel, Fiber, Feedstocks and Pharmaceuticals”), sem esquecer ainda a sua aplicação ambiental, quer no tratamento de efluentes, quer em processos de bioremediação.

Apesar de terem passado mais de 50 anos desde a implementação da produção em larga escala da penicilina, de se terem descoberto muitos outros antibióticos de origem microbiana e de se terem modificado outros tantos por síntese química, a guerra contra os microrganismos patogênicos está longe de ser ganha. Este facto torna a pesquisa de novos antibióticos, a área mais importante da microbiologia industrial actual. Os

programas de rastreio intensivo em todos os países industrializados levam ao aumento contínuo do número de antibióticos descritos: 513 em 1961, 7650 em 1985 e mais de 8500 actualmente, embora apenas cerca de 130 sejam produzidos industrialmente.

O significado biológico da produção de antibióticos pela estirpe produtora ainda não é muito claro, embora não seja de descurar o seu significado ecológico para a sobrevivência do microrganismo na natureza. Tanto quanto se sabe, os microrganismos produtores de antibióticos distribuem-se por três grupos de organismos formadores de esporos: fungos filamentosos (ex. *Penicillium chrysogenum*), bactérias formadoras de esporos (ex. *Bacillus subtilis*) e bactérias actinomicetas (ex. *Streptomyces griseus*).

1. Isolamento de actinomicetas e pesquisa de estirpes produtoras de antibióticos

As actinomicetas são bactérias Gram positivas que podem desenvolver micélio superficial e submerso, por vezes fragmentável, com hifas de 0,5 a 2,0 μm de diâmetro, facto que as levou a serem inicialmente classificadas como fungos. Muitas apresentam ainda a formação de esporos aéreos, conídios, dispostos em cadeia ou em esporângios (Fig. 10.1. e Fig 10.2.).



Fig. 10.1. Representação esquemática de uma colónia de bactéria actinomiceta na qual se evidenciam: o micélio submerso, o micélio superficial e as cadeias de conídios.

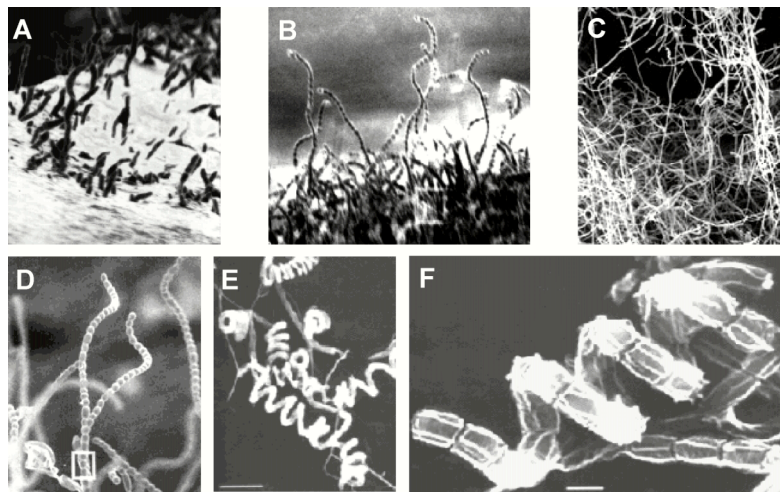


Fig. 10.2. Aspectos do micélio de actinomicetas observado em microscopia electrónica de varrimento. (A) Hifas aéreas emergindo, (B) camada de hifas aéreas, (C) micélio submerso, (D) ampliação de uma hifa aérea, (E) hifa aérea enrolada e (F) hifa aérea enrolada (pormenor).

Este grupo de bactérias heterotróficas constitui uma proporção considerável dos microrganismos do solo ($10^4 - 10^6$ esporos de actinomicetas por grama de solo), embora também se possa encontrar naturalmente noutros ecossistemas como lamas do fundo de rios ou lagos, água do mar e nichos a ela associados, plantas, entre outros. Nestes ambientes, desempenham um papel fundamental na mineralização da matéria orgânica devido à sua capacidade de degradação de uma grande variedade de compostos, como por exemplo, a gelatina, caseína e o amido. São todos microrganismos aeróbios altamente oxidativos, que apresentam temperatura e pH óptimos de crescimento entre $25^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ e $6,5 - 8,0$, respectivamente.

Dentro do grupo de actinomicetas, o género *Streptomyces* (Fig. 10.3.) é o de maior interesse comercial já que, mais de 70% antibióticos processados industrialmente, são produzidos por exemplares deste género. No entanto, as capacidades metabólicas extremamente vastas destes microrganismos que lhes permitem produzir uma grande variedade de compostos, podem torná-los indesejáveis. É o caso da contaminação de sistemas de abastecimento de água para consumo, devido à produção de compostos voláteis (geosmina e 2-metilisoborneol), que conferem à água um sabor muito desagradável.

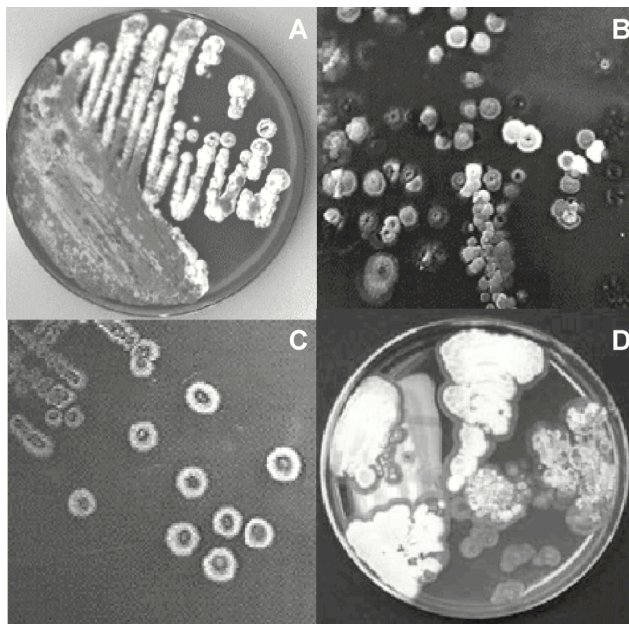


Fig. 10.3. Aspecto macroscópico de diversas colónias de *Streptomyces* sp. (A) *S. clavurigerus*, (B) *S. lividans*, (C) *S. coelicolor* e (D) *S. venezuelae*.

A procura de antibióticos pela indústria farmacêutica, constitui um bom exemplo de como as técnicas de isolamento e rastreio de estirpes a partir do meio ambiente, são importantes na selecção de microrganismos para aplicação industrial. O sucesso de um procedimento deste tipo depende, quer da selecção inicial das amostras, quer de uma sequência de passos experimentais adequada.

	<i>Isolamento de actinomicetas</i>
--	---

1. Obter uma amostra de solo (os solos arenosos favorecem o género *Streptomyces* em relação aos solos ricos em compostos orgânicos).
2. Misturar 1 g de solo com igual quantidade de CaCO_3 numa caixa de Petri.
3. Incubar à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) durante uma semana.
4. Adicionar 0,1 g da mistura solo- CaCO_3 a 100 ml de H_2O desmineralizada esterilizada e agitar vigorosamente.
5. Inocular utilizando a técnica de espalhamento em superfície, 100 μl da suspensão anterior numa placa de meio Amido-Caseína (AC).
6. Incubar as placas a 28°C durante 6 - 7 dias.

7. Identificar as colônias de bactérias actinomicetas através da sua morfologia típica (Fig. 10.4). Estas colônias são pequenas (1 a 10 mm de diâmetro), no início têm uma aparência relativamente macia e sem brilho, passando, depois do desenvolvimento do micélio aéreo, a apresentar um aspecto bastante denso e granuloso, pulveroso, floculoso e/ou aveludado. Uma vez que estes microrganismos produzem uma grande variedade de compostos pigmentados, as colônias e/ou meio de crescimento podem desenvolver diferentes cores.
8. Calcular o número de bactérias actinomicetas por grama de solo.

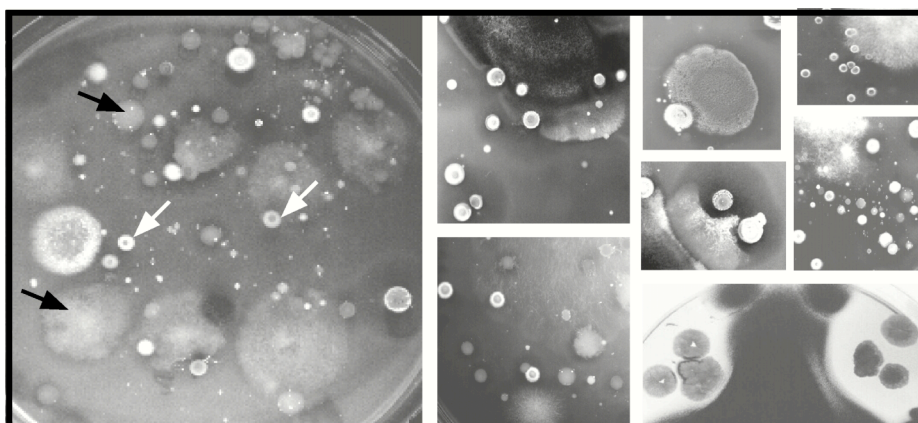


Fig. 10.4. Aspecto de placas de meio AC inoculadas com uma suspensão de solo e incubadas uma semana a 28°C. Nas imagens é possível observar colônias com morfologia típica de bactérias actinomicetas (setas brancas) e colônias grandes pouco densas, ou colônias com brilho (ambas setas pretas), a despezar neste trabalho.

Identificação de estirpes produtoras de antibióticos

1. Transferir por meio de palitos estéreis, 3 colônias distintas de actinomicetas isoladas na experiência anterior, para 2 placas com meio Nutrient Agar (NA).
2. Incubar as placas a 25°C durante 4 ou 5 dias.
3. Preparar independentemente em 5 ml de água desionizada esterilizada, uma suspensão de *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* (microrganismos teste)
4. Liquefazer o meio NA semi-sólido, pipetar 5 ml para cada um de 2 tubos de ensaio esterilizados e mantê-los em banho-maria a 42°C.

5. Inocular separadamente 0,1 ml de cada uma das suspensões bacterianas contendo os microrganismos teste, nos 2 tubos de ensaio anteriores.
6. Agitar os tubos no vortex e verter o conteúdo nas duas placas de meio NA onde se desenvolveram as 3 massas celulares de actinomicetas. Rodar levemente as placas de modo a que se forme um tapete homogêneo (*overlay*).
7. Deixar solidificar o meio e incubar as placas a 37°C durante a noite.
8. Registrar a presença de halos de inibição do crescimento de *E. coli* e *B. subtilis*, na vizinhança das massas celulares das bactérias actinomicetas seleccionadas (Fig. 10.5.).

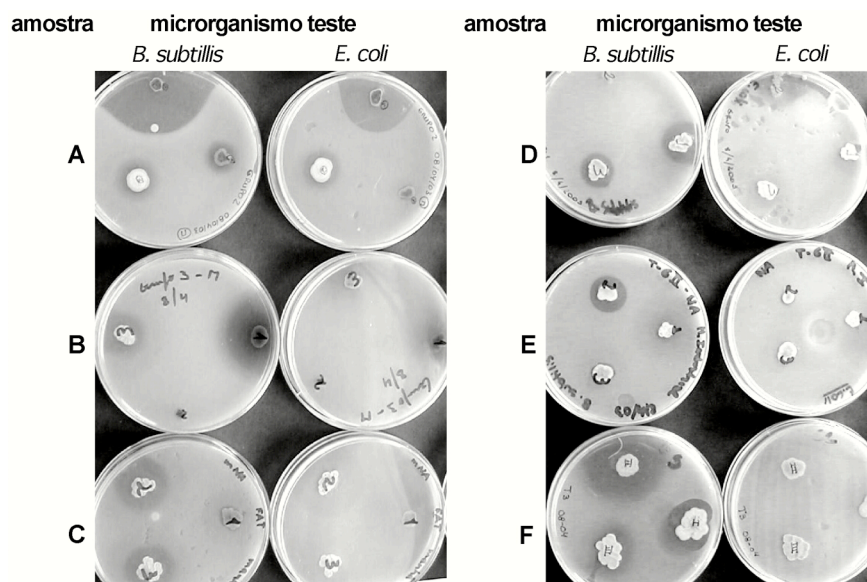


Fig. 10.5. Aspecto das placas obtidas, para bactérias actinomicetas seleccionadas a partir de seis amostras de solo de proveniência diversa (A a F).

2. Avaliação da eficácia de substâncias antimicrobianas

Os microrganismos podem competir entre si num dado ambiente (na natureza ou em laboratório), inibindo o crescimento ou desenvolvimento uns dos outros, quer pela libertação de produtos metabólicos que alteram o meio tornando-o desfavorável, quer pela produção de substâncias químicas específicas de que são exemplo os antibióticos (Tab. 10.1). A acção destes compostos não se faz sentir de forma idêntica em todas as espécies, designando-se por espectro de acção de um antibiótico, a quantidade e o tipo

de microrganismos sobre o qual actua. Diz-se que um antibiótico possui largo espectro de acção, se é eficiente na inibição do crescimento de uma gama alargada de microrganismos não relacionados. A eficácia de um antibiótico depende assim, tanto da sensibilidade dos microrganismos, como de outros factores relacionados quer com o próprio antibiótico, quer com o hospedeiro. Entre eles podemos destacar a estabilidade *in vivo*, a taxa de absorção, a taxa de eliminação e a capacidade de penetração no local de infecção.

Tab. 10.1. Exemplos de alguns antibióticos e descrição sumária dos seus modos de acção.

Antibiótico	Produzido por		Mecanismo de acção
Penicilina	Fungos	<i>Penicillium sp.</i>	Inibição da síntese da parede celular
Cefalosporina		<i>Cephalosporium sp.</i>	“
Polimixinas	Bacilos	<i>Bacillus polymyxa</i>	Alteração das membranas celulares
Bacitracina		<i>Bacillus subtilis</i>	Inibição da síntese da parede celular
Cloranfenicol	Actinomicetas	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Interferência nos mecanismos de síntese proteica
Estreptomicina		<i>Streptomyces griseus</i>	“
Tetraciclina		<i>Streptomyces rimosus</i>	“
Canamicina		<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	“
Neomicina		<i>Streptomyces fradie</i>	“

A determinação da susceptibilidade de uma estirpe microbiana a um agente patogénico, é particularmente importante na selecção do agente mais apropriado ao tratamento de determinada doença. O teste de Kirby-Bauer ou antibiograma constitui actualmente um dos métodos utilizados com este objectivo. Este método consiste na colocação de discos com concentrações conhecidas de determinado antibiótico, na superfície de uma placa contendo um meio sólido apropriado e previamente inoculada com o microrganismo cuja susceptibilidade se pretende testar. O antibiótico difunde-se a partir do disco para o meio circundante, formando um gradiente de concentração que decresce desde o perímetro do disco até distâncias mais elevadas. Os microrganismos multiplicam-se exponencialmente em toda a superfície da placa, à excepção das zonas à volta do disco impregnado de antibiótico ao qual são sensíveis. As zonas em que o seu crescimento é inibido ou a sua morte é provocada pela concentração do antibiótico, tornam-se visíveis através de uma zona clara que rodeia o disco e a que se dá o nome de halo de inibição ou zona de inibição(Fig. 10.6.). Os grupos de microrganismos não inibidos pelo antibiótico, dizem-se resistentes a este agente.

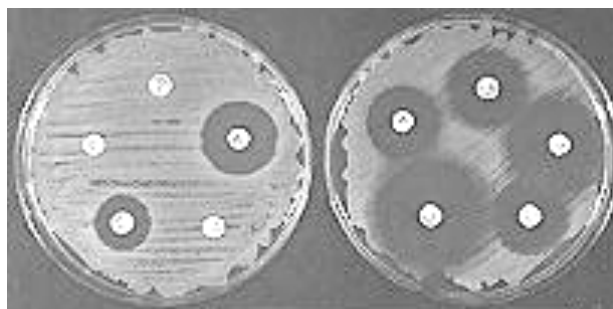


Fig. 10.6. Antibiograma pelo método de Kirby-Bauer.

A eficácia de um antibiótico é determinada preliminarmente pelo diâmetro do halo de inibição de crescimento observado, dado que para condições experimentais semelhantes, quanto maior for a zona de inibição, mais sensível é a estirpe estudada. No entanto, as condições experimentais devem ser padronizadas uma vez que o diâmetro desta zona depende ainda de outros factores como sejam a facilidade com que o antibiótico se difunde no agar e o meio de cultura utilizado. Só assim será possível, a partir da dimensão da zona de inibição observada e para um determinado antibiótico, classificar uma estirpe como resistente, susceptível ou intermédia. De referir ainda, que o método de Kirby-Bauer só é aplicável a microrganismos de crescimento rápido e que não sejam anaeróbios obrigatórios, aspectos que constituem as principais limitações deste método.

	<i>Avaliação da eficácia de antibióticos pelo método Kirby-Bauer</i>
--	---

1. Marcar 5 placas de Petri contendo meio Muller-Hinton com a referência do grupo de trabalho, data de inoculação e a designação da bactéria/bactérias a utilizar.
2. Agitar a cultura a inocular e retirar cerca de 0,2 ml da cultura.
3. Colocar esta suspensão na superfície do agar e dispersar com espalhador de vidro arrefecido após esterilizado à chama.
4. Esperar 5 minutos para que o líquido da cultura seja embebido no agar.
5. Aplicar os discos de papel nas placas após terem sido mergulhados nas soluções dos diferentes antibióticos.
6. Utilizar o mesmo padrão de distribuição para todas as caixas. Colocar um disco embebido em água (controlo).
7. Tomar nota na folha de registo, dos antibióticos usados e respectivos códigos .

8. Incubar 18 horas a 35 °C, as placas de Petri inoculadas tendo o cuidado de não as inverter.
9. Medir os diâmetros das zonas de inibição de cada antibiótico, utilizando uma régua ou craveira (Fig. 10.7.).
10. Classificar a reacção (resistente, intermédia ou sensível) das bactérias a cada antibiótico de acordo com os padrões da Tabela 10.2.

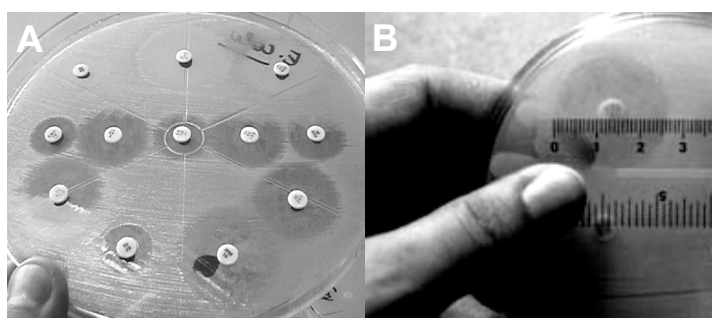


Fig. 10.7. (A) Observação dos halos de inibição de crescimento desenvolvidos e (B) medição do respectivo diâmetro.

Tab. 10.2. Significado do diâmetro da zona de inibição de crescimento bacteriano na avaliação da eficácia de antibióticos através do método de Kirby-Bauer (adaptado de Claus, 1989).

Agente quimioterapêutico	Diâmetro da zona de inibição (mm)			
	Potência do disco	Resistente	Resistência intermédia	Sensível
Ampicilina • bactérias Gram negativas • <i>Staphylococcus aureus</i> e bactérias susceptíveis à penicilina-G	10 µg 10 µg	<12 <21	2-13 21-28	>13 >28
Bacitracina	10 U	<9	9-12	>12
Carbenicilina • <i>Proteus</i> sp. e <i>E. coli</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 µg 50 µg	<18 <13	18-22 13-14	>22 >14
Cloranfenicol	30 µg	<13	1-17	>17
Clindamicina	2 µg	<15	15-16	>16
Colistina	10 µg	<9	9-10	>10
Eritromicina	15 µg	<14	14-17	>17
Canamicina	30 µg	<14	14-17	>17
Meticilina (classe de penicilinas resistentes à penicilinase)	5 µg	<10	10-13	>13
Neomicina	30 µg	<13	13-16	>16
Estreptomicina	10 µg	<12	12-14	>14
Tetraciclina	30 µg	<15	15-18	>18

	Materiais biológicos
--	-----------------------------

Espécies

Escherichia coli

Bacillus subtilis

	Meios de cultura e soluções
--	------------------------------------

Composição dos meios de cultura

Meio Amido-Caseína (AC) ou agar de Mueller-Hinton

Extracto de carne	30,0 g
Caseína hidrolisada	17,5 g
Amido	1,5 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Acertar a pH 7,4. Distribuir em porções de 250 ml e autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Usar 25 ml por cada caixa de Petri

Meio Nutriente Agar (NA)

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Distribuir em porções de 250 ml e autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Usar 25 ml por cada caixa de Petri

Meio Nutriente Agar semi-sólido (NA-semi-sólido)

Preparar de acordo com o meio anterior utilizando apenas 8 g de agar por cada litro de solução.

Composição das soluções

Soluções filtradas de: canamicina (50 mg/l), estreptomicina (100 mg/l), penicilina (100 U/ml), gentamicina (50 mg/l).

	<i>Tópicos para discussão</i>
--	--------------------------------------

- Especule acerca das possíveis funções que os antibióticos possuem para os microrganismos que os produzem.
- Descreva o aspecto macroscópico típico das colónias de bactérias actinomicetas.
- Aprecie a lógica subjacente a um processo de isolamento e rastreio de microrganismos de interesse industrial, a partir de amostras obtidas do ambiente.

	<i>Bibliografia</i>
--	----------------------------

- Claus, G.W., 1989, Understanding Microbes. A laboratory textbook for microbiology. W.H.Freeman and Company; New York.
- Crueger, W., Crueger, A., 1989 Biotechnology – A Textbook of Industrial Microbiology. 2nd Ed, Brock, T.D. (ed); Sinauer Associates, Inc.; Sunderland.
- Madigan, m.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1997 Biology of Microrganisms. 8th Ed, Prentice Hall International, Inc; London

	<i>WWW</i>
--	-------------------

- <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Antibiotics.html>
- <http://www.people.ku.edu/~jbrown/penicillin.html>
- <http://www.blm.gov/nstc/soil/bacteria/>
- <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lecturebactres>
- <http://www.science.widener.edu/~stjohn/page10.html>