

Potencial antimicrobiano de extratos extracelulares de isolados de actinobactérias e de suas frações orgânicas

Antimicrobial potential of extracellular extracts of actinobacterial isolates and their organic fractions

DOI:10.34117/bjdv7n10-465

Recebimento dos originais: 07/09/2021

Aceitação para publicação: 04/10/2021

João Soares Santos

Doutorando em Ciências da Educação, pela Universidade Nacional de Rosario (UNR Argentina), mestre em Biotecnologia, Licenciado em Ciências Biológicas e Pedagogia.
E- mail: joao.soares.2@hotmail.com

Marcelo Ferreira Fernandes

Doutorado em Soil Science. Oregon State University, OSU, Estados Unidos Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros- Aracaju, SE – Brasil. Homepage: <http://www.embrapa.br>
E- mail: marcelo.fernandes@embrapa.br

Érika Cristina Teixeira Dos Anjos

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
E- mail: erikaanjos@yahoo.com.br

Roberta Pereira Miranda Fernandes

Doutorado em Pharmacy. Oregon State University, OSU, Estados Unidos. Endereço Profissional. Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Fisiologia.

RESUMO

A utilização de micro-organismos antagonistas e seus metabólitos secundários no controle de fitopatógenos é alvo de grande interesse, já que pode constituir uma alternativa de menor impacto no ambiente em relação aos químicos sintéticos. O cultivo de novos isolados de bactérias antagonistas, além dos gêneros *Streptomyces* e *Bacillus*, os quais são fontes da ampla maioria dos antibióticos conhecidos, amplia a possibilidade de descobrir novas moléculas com potencial antimicrobiano. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de extratos extracelulares de culturas de actinobactérias do solo e de suas frações orgânicas contra os organismos-alvo *Xanthomonas campestris* 629, *Bacillus cereus* ATCC14579 e *Saccharomyces cerevisiae* V200. Neste estudo foram utilizados cinco isolados de actinobactérias do solo (isolados TC42, TC44, TC70, TC105 e TCX, da Embrapa Tabuleiros Costeiros).

Palavras-chave: actinomicetos, controle biológico, viáveis mas não-cultiváveis.

ABSTRACT

The use of antagonistic microorganisms and their secondary metabolites in the control of phytopathogens is a target of great interest, since it may constitute an alternative of less impact on the environment in relation to synthetic chemicals. The cultivation of new isolates of antagonistic bacteria, in addition to the genera *Streptomyces* and *Bacillus*,

which are sources of the vast majority of known antibiotics, increases the possibility of discovering new molecules with antimicrobial potential. Thus, the present work aimed to evaluate the antimicrobial potential of extracellular extracts from cultures of soil actinobacteria and their organic fractions against the target organisms *Xanthomonas campestris* 629, *Bacillus cereus* ATCC14579 and *Saccharomyces cerevisiae* V200. Five isolates of soil actinobacteria (isolates TC42, TC44, TC70, TC105 and TCX, from Embrapa Tabuleiros Costeiros) were used in this study.

Key-words: actinomycetes, biological control, viable but not cultivable.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a utilização de micro-organismos para solucionar problemas relacionados à produção de alimentos é uma área bastante explorada, e os metabólitos microbianos utilizados como produtos agroativos são de extrema importância ecológica e econômica, tendo em vista a redução dos efeitos ambientais causados pelos compostos químicos sintéticos. O uso indiscriminado de defensivos agrícolas prejudica a microbiota natural do solo, além de acarretar graves problemas à saúde do homem e ao meio ambiente.

Neste contexto, uma alternativa viável para atenuar essa problemática é a utilização de actinobactérias produtoras de antibióticas, de enzimas e de fitotoxinas. As actinobactérias são micro-organismos Gram-positivos, com alto conteúdo de G+C (Guanina + Citosina) em seu DNA, com crescimento vegetativo na forma de micélio e com hifas ramificadas.

Geralmente, essas bactérias formam colônias pequenas e bem aderidas ao substrato, com esporos disseminados, os quais podem ser encontrados na parte aérea do micélio ou nas hifas aderidas ao substrato, ou em ambos; podendo ainda se agrupar em conídios com diferentes formas ou em esporângios ou apresentar mobilidade em algumas espécies.

Esses micro-organismos são amplamente distribuídos na natureza, comumente encontradas no solo, onde atuam na reciclagem de material orgânico, como lignocelulose encontrada no subsolo, em ambientes marinhos e a maioria das espécies são: quimiorganótroficas, aeróbias, mesófilas, e de crescimento próximo a pH neutro. No entanto, existem actinobactérias termofílicas, acidófilas e alcalifílicas.

Além da sua importância na ciclagem de nutrientes, essas bactérias são conhecidas pela produção de substâncias de alto potencial biotecnológico, tais como vitaminas do

complexo B, enzimas (*e.g.* xilanases, lipases, quitinases, fosfatases), agentes antitumorais, cardiovasculares, imunomoduladores e, principalmente, antibióticos.

Atualmente, a ordem Actinomycetales é a principal fonte de antibióticos, contribuindo com cerca de 3000 moléculas, a maioria (>90%) produzida por representantes do gênero *Streptomyces*. No entanto, o potencial biotecnológico de outras Actinobacteria é amplamente desconhecido. Portanto, alternativas de cultivo bacteriano que permitam ampliar a base genética destes organismos produtores de moléculas com ação antimicrobiana são essenciais para a descoberta de novos produtos com potencial biotecnológico.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de frações de isolados de actinobactérias do solo (TC42, TC44, TC70, TC105 e TCX) contra *Xanthomonas campestris* 629, *Bacillus cereus* ATCC14579 e *Saccharomyces cerevisiae* V200, como uma abordagem preliminar para a busca de novas moléculas com potencial biotecnológico. Os isolados utilizados foram do banco de bactérias de solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju - SE.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas com alto teor de G+C (guanina + citosina), taxonomicamente classificadas na divisão Actinobacteria, classe Actinobacteria e ordem Actinomycetales (GARRITY; BELL; LILBURN, 2003).

As actinobactérias são encontradas em diversos habitats como solos, desertos, ambientes aquáticos, plantas, dentre outros, caracterizando-se pela sua capacidade de crescimento em diversos substratos (MCCARTHY; WILLIAMS, 1990; HUANG *et al.*, 2012; MOHANDAS *et al.*, 2013; VICENTE *et al.*, 2013).

Estes organismos apresentam um crescimento micelial em uma parte do ciclo de vida, e exibem uma grande variedade de formas, tais como cocoide ou cocobacilo (GOODFELLOW, 1989; HOLT *et al.*, 1994). As características morfológicas como ramificação do micélio sobre o substrato, formação de micélio aéreo e sua fragmentação ou produção de esporos são fatores que auxiliam na identificação das actinobactérias. (VENTURA *et al.*, 2007). Em muitos gêneros há diferenciação posterior com a formação de esporos e esporângios. Na maioria dos casos, os esporos são utilizados para a dispersão, mas alguns produzidos por *Micromonospora* spp. têm sua resistência aumentada especialmente na estiagem. Muitas espécies sintetizam moléculas bioativas,

particularmente as espécies *Streptomyces* e *Micromonospora*, produtoras de compostos comerciais (CUESTA *et al.*, 2012).

Os actinomicetos têm sido isolados de uma ampla variedade de tipos de solo em diferentes regiões geográficas, sob condições úmidas e secas, e faixas de pH entre 4 e 10 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A taxonomia de Actinobacteria, com base nas análises de sequências de RNAr 16S, compreende 130 gêneros e 39 famílias neste filo (VENTURA *et al.*, 2007). Embora diversos representantes cultivados deste filo sejam conhecidos, a obtenção recente de novos isolados pertencem a famílias até então não descritas representa uma oportunidade para a busca e descoberta de novas moléculas de importância biotecnológica (CAVALCANTE, 2012). Neste sentido, Hughenholtz *et al.* (1998) ressaltam que diferenças filogenéticas entre divisões bacterianas podem refletir diferenças fisiológicas substanciais. A capacidade de obtenção de novos representantes cultivados de Actinobacteria mediante a utilização de métodos alternativos simples de isolamento foi bem descrita por Joseph *et al.* (2003), que mostraram que de 350 isolados de bactérias do solo, 25 pertenceram a quatro novas famílias da subclasse Actinobacteridae.

Membros desta subclasse, representada por pelo menos 129 gêneros reconhecidos e nomeados em 40 famílias distintas, são importantes fontes de antibióticos e outros compostos bioativos, o qual tem motivado às buscas intensivas por novas estirpes (GARRIT *et al.*, 2001, JOSEPH *et al.*, 2003).

2.2 METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE MICROORGANISMOS COM ATIVIDADE ANTAGONISTA

Todos os organismos vivos crescem e se reproduzem utilizando rotas metabólicas muito semelhantes, ou até idênticas, para gerar energia, através do metabolismo primário. Há, porém, outras rotas metabólicas que possibilitam aos organismos produzirem diversos metabólitos, alguns dos quais restritos a certos gêneros ou espécies. Essas rotas constituem o metabolismo secundário, ou seja, produtos não essenciais para a vida do organismo e que são normalmente sintetizados na fase estacionária, e também durante o seu crescimento (VINING, 1986; HECK, 2007).

Os metabólitos secundários estão presentes em diversos organismos. As plantas, por exemplo, os produzem como uma forma de proteção contra predadores e para a reprodução, enquanto em insetos estes metabólitos são utilizados para sua comunicação ou proteção (VINING, 1986; HECK, 2007).

Os fatores que desencadeiam a síntese de metabólitos secundários geralmente estão associados à escassez de algum nutriente essencial, como carbono, nitrogênio ou fosfato (VING, 1986; OCHI, 2007; HECK, 2007). Contudo, não se conhece a função de muitos produtos do metabolismo secundário; porém, cada organismo responde de maneira diferente à depleção de um ou de outro nutriente. Portanto, na produção de um dado metabólito secundário é necessário estudar cada espécie em particular, pois uma mudança nas condições de cultivo pode inibir a síntese ou, ainda, levar à produção de outras moléculas (HECK, 2007).

Sabe-se que a ordem Actinomycetales é a principal fonte de antibióticos, contribuindo com cerca de 3000 moléculas, a maioria (>90%) produzidas por representantes do gênero *Streptomyces* (CLARDY *et al.*, 2006). Além disto, aproximadamente 65% de mais de 6000 antibióticos descritos são sintetizados por *Streptomyces* (ARAÚJO, 1998).

Assim, para o controle biológico de fitopatógenos disponíveis no mercado, há diversos produtos bacterianos, sendo a maioria baseada em isolados do filo Actinobacteria; principalmente, do gênero *Streptomyces*, como por exemplo, Actinovate® e Mycostop® obtidos de *S. lydicus* e de *S. griseoviridis*, respectivamente. Esta alta concentração de produtos derivados de *Streptomyces* deve-se à facilidade de isolamento e de cultivo destas bactérias em condições de laboratório (CAVALCANTE, 2012).

Com isto, o potencial biotecnológico de outras Actinobacterias é desconhecido (CLARDY *et al.*, 2006; van WEZEL *et al.*, 2006), sendo preciso alternativas para o cultivo bacteriano que permitam ampliar a base genética de organismos produtores de compostos com ação antimicrobiana ou seja, a descoberta de novos produtos com potencial biotecnológico. Dentre as moléculas com este potencial, destacam-se os policetídeos e os peptídeos não-ribossomais (PARSLEY *et al.*, 2011)

Policetídeos e peptídeos não ribossomais, produzidos por diversos organismos, incluindo bactérias (e.g. *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus licheniformis*, *B. brevis*, e diversos actinomicetos, como *Streptomyces griseus* e *S. coelicolor*), são moléculas com elevado potencial antimicrobiano contra um amplo espectro de patógenos (COMPANT *et al.*, 2005).

Dentre os peptídeos não-ribossomais com ação antimicrobiana, podem ser citados a gramicidina S de *B. brevis*; a bacitracina de *B. licheniformis*; a vancomicina, de *S. orientalis* e pioverdina de *P. aeruginosa* (Marahiel *et al.*, 1997). Embora o filo

Actinobacteria seja o principal alvo em estudos de prospecção de novos agentes antimicrobianos, (PARSLEY *et al.*, 2011) identificaram em uma biblioteca metagenômica do solo, rotas para policetídio sintases no filo Acidobacteria. Este filo possui raros representantes cultivados, podendo ser uma fonte expressiva de novos policetídeos, estruturalmente diversos e com atividade antimicrobiana.

O gênero de actinobactéria *Micromonospora* produz alcaloides manzaminas, cujos testes pré-clínicos indicaram ser potentes agentes antimaláricos (RAO *et al.*, 2004), enquanto que *Micromonospora sp.* M39 isolada da rizosfera de manguezal produz substâncias com ação antifúngica (ISMET *et al.*, 2004).

Assim, de acordo com Tuntiwachwuttikul (2008), *Streptomyces* são microorganismos promissores com alta capacidade de produzir actinomicinas biologicamente ativas, tendo, ainda, sido isolados e identificados estruturalmente quatro novos compostos com atividades antifúngicas e antineoplásicos. A geldanamicina, pertencente à família das ansamicinas, provenientes do metabolismo secundário de actinobactérias, é um agente anticancerígeno produzido por *S. hygroscopicus* (TUNTIWACHWUTTIKUL, 2008)

Recentemente, estudos com actinobactérias marinhas foram associados aos gêneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia*, *Verrucosipora*, *Rhodococcus*, *Agrococcus*, *Saccharomonospora*, que atuam protegendo os corais contra três bactérias comuns e contra três bactérias marinhas patogênicas, sendo então verificadas atividades antimicrobianas de actinobactérias em seus diferentes habitats (ZHANG *et al.*, 2013).

Neste contexto, se insere um estudo recente com a actinobactéria *S. arenicola*, de cujo caldo de cultivo foi obtida a arenimicina, um novo antibiótico, com potente atividade antimicrobiana contra estafilococos resistentes a medicamentos. Sua estrutura molecular foi identificada como pertencente à classe de antibióticos rifamicina (ASOLKAR *et al.*, 2010).

Ainda, as bactérias marinhas da ordem Actinomycetales oferecem uma rica fonte de moléculas bioativas com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (ZHANG *et al.*, 2013). Os estudos do isolamento de actinobactérias provenientes da interação com formigas (*Atta spp.*) permitiram à descoberta dos antifúngicos dentigerumicina, mycangimycin e sceliphrolacta (GUO *et al.*, 2013), enquanto que da actinobactéria isolada do intestino de gafanhoto *Amycolatopsis sp.* HCa1, (*Oxya chinensis*) foram descobertos sete diferentes metabólitos (GUO *et al.*, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS

Neste estudo foram utilizados cinco isolados de actinobactérias do solo (TC42, TC44, TC70, TC105 e TCX), previamente selecionadas quanto à atividade antimicrobiana quando em co-cultivo com os fitopatógenos *X. campestris* e *T. paradoxa* (BARRETO, 2013). Todos os isolados pertencem à coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju – SE.

Desses isolados, os TC42 e TC70 foram afiliados às famílias *Pseudonocardiaceae* e *Micrococcaceae*, com máximo de similaridade do 16S rDNA observado com *Pseudonocardia* sp. e *Sinomonas* sp. (CAVALCANTE, 2012), enquanto os TC44 e TC105 não foram afiliados a famílias descritas, de acordo com análise filogenética proposta por (JOSEPH *et al.* 2003), embora apresentem máxima similaridade do 16S DNAr com sequências de *Corynebacterium* e *Micromonospora*, respectivamente (CAVALCANTE, 2012). A manutenção dos isolados é feita em meio inclinado com óleo mineral a 4°C e em meio líquido com glicerol a -20°C e -80°C.

3.2 ISOLADOS DE MICRO-ORGANISMOS ALVO

Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizadas os seguintes microorganismos alvos: *X. campestris* 629 IBSBF, da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas - SP, *B. cereus* ATCC 14579, e *S. cerevisiae* V200, do banco de fungos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Sergipe. Estes organismos foram selecionados como alvos representantes de modelos celulares procariotos (Gram-negativos e positivos) e eucariotos, respectivamente.

3.3 MEIOS DE CULTURA PARA CULTIVO E AVALIAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS

Os meios de cultura utilizados foram ISP2 (PRIDHAM *et al.*, 1957), ágar nutriente e meio caseína-amido (WELLINGTON e TOTH, 1994).

O meio ISP2 foi constituído por ágar bacteriológico (18,0 g L⁻¹), acrescido de extrato de levedura (4,0 g L⁻¹), extrato de malte (10,0 g L⁻¹) e dextrose (4,0 g L⁻¹) e pH ajustado para 6,0. O meio ágar nutriente é composto por extrato de levedura (1,5 g L⁻¹), extrato de carne (1,5 g L⁻¹), peptona bacteriológica (5,0 g L⁻¹), com pH 6,0. O meio caseína-amido foi composto por amido solúvel (10,0 g L⁻¹) caseína hidrolisada (0,3 g L⁻¹)

¹), KNO_3 (2,0 g L⁻¹), NaCl (2,0 g L⁻¹), K_2HPO_4 (2,0 g L⁻¹), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g L⁻¹), CaCO_3 (0,02 g L⁻¹), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g L⁻¹), ágar bacteriológico (20,0 g L⁻¹), com pH 7,0. Após esterilização (121°C/20 min), os meios foram dispensados em placas de Petri estéreis de 90 mm (HAYNES *et al.*, 1955), inoculados com as culturas ativadas em meio de cultura líquido com composição química idêntica à dos meios de isolamento de cada bactéria (CAVALCANTE, 2012). As placas foram incubadas a 30°C por uma semana e inspecionadas quanto ao crescimento das actinobactérias.

Os meios líquidos foram preparados com a mesma composição química descrita para os meios ISP2, ágar-nutriente e caseína-amido, porém isentos de ágar, dispensando 60 mL desses meios em Erlenmeyers de 125 mL, autoclavados e inoculados com os isolados das actinobactérias e incubados a 30°C, por 48 h e a 160 rpm. Após este período, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 14000×g e o pH do sobrenadante foi medido (marca do pHmetro modelo, cidade, país).

Para evitar a interferência da acidificação do meio de cultura sobre o crescimento de microorganismos alvo, os referidos meios foram preparados em tampão fosfato de sódio 50 mM e 100 mM, pH 6,0 e analisados quanto a acidificação, após crescimento das actinobactéria, sob as condições e tempo de incubação já descritos.

3.4. CURVAS DE CRESCIMENTO DE ACTINOBACTÉRIAS E OBTENÇÃO DE EXTRATOS EXTRACELULARES

Os isolados das actinobactérias foram inoculadas em ISP2, com tampão fosfato 50 mM (ISP2 TF50). Este meio de cultura foi selecionado na etapa anterior para permitir o crescimento dos isolados e resistir à variação de pH após 48 h de incubação.

O inóculo desta etapa foi preparado a partir de culturas mantidas a 4°C sob óleo mineral, que foram inoculadas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 60 ml de meio ISP2 TF50 e incubadas sob agitação (160 rpm/30°C). Durante a fase exponencial de crescimento, alíquotas de 2 mL foram retiradas, centrifugadas (14000 rpm/ 4°C por 5 minutos) e as células lavadas duas vezes em NaCl a 0,85% para remover o excesso de meio de cultura. O pellet celular foi ressuspensionado em NaCl a 0,85% até densidade óptica (D.O.) de 0,5 ($\lambda = 500$ nm), para padronizar o inóculo a ser utilizado.

Em seguida, volumes de 250 μL de inóculos padronizados de actinobactérias foram inoculados em 60 mL de meio ISP2 TF50 em Erlenmeyers de 125 mL, enquanto para TC42 foi utilizado o meio ISP2 TF100. Os inóculos foram feitos em triplicatas, sendo o conteúdo dos frascos imediatamente homogeneizado, antes da retirada de

alíquotas de 2 mL, que foram centrifugadas (14000 rpm/ 4°C por 5 minutos) e o sobrenadante armazenado a -20°C para posterior análise de inibição dos organismos alvo pelos extratos extracelulares.

Ainda, alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada frasco para determinar a D.O. inicial das culturas ($\lambda = 500$ nm). Em seguida, os frascos foram incubados (160 rpm, 30°C), retirando-se amostras a cada 1 h, seguido de centrifugação para avaliar a D.O até atingir leitura $> 2,5$ e armazenamento dos extratos. A coleta de extratos para TC105 e TCX foi feitas até um período de 8 h, enquanto para os demais isolados esta coleta foi realizada por 11 h. Os meios de cultura sem inoculação com as actinobactérias (controle negativo) também foram incubados sob as mesmas condições experimentais para amostragem e armazenamento de extratos.

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS EXTRACELULARES

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos de culturas de actinobactérias incubadas em diferentes tempos de incubação foi realizada contra *X. campestris*, *B. cereus* e *S. cerevisiae* utilizados como microorganismos-alvo. As bactérias-alvo foram cultivadas e mantidas em meios de cultura YM, e a levedura em meio Sabouraud dextrose (SANDVEN e LASSEN, 1999). Para reativar estes organismos, seu cultivo foi feito até a fase exponencial. Para as culturas em fase exponencial foram utilizados inóculo padronizados após centrifugação e lavagem de células em NaCl a 0,85%. Volumes de 250 μL dos inóculos padronizados foram inoculados em 60 mL de meios YM e Sabouraud dextrose, até atingir D.O. de 10^5 células mL^{-1} para as bactérias e de 10^4 mL^{-1} para a levedura (COS *et al.*, 2006).

Alíquotas de 180 μL dos inóculos alvo foram adicionadas aos poços de placas de titulação de 96 poços. Em seguida, 20 μL dos sobrenadantes do meio fermentado pelas actinobactérias foram adicionados aos poços. Como controles negativos, utilizaram-se volumes de 20 μL das alíquotas coletadas dos frascos não inoculados com actinobactérias. Poços contendo meios de cultura YM e Sabouraud sem inoculação dos micro-organismos alvo foram utilizados nas placas como controle de não contaminação durante a avaliação da atividade antimicrobiana. Cada uma das alíquotas coletadas durante o crescimento das actinobactérias, assim como dos controles não inoculados, foram avaliadas em triplicatas nas placas.

O crescimento das culturas nos poços foi avaliado por meio das leituras de D.O., as quais foram realizadas imediatamente após a inoculação dos microorganismos alvo

(tempo zero) e após 9 h de incubação para *S. cerevisiae* e para *B. cereus* e de 16 h para *X. campestris*.

A inibição do crescimento dos organismos alvo pelos extratos extracelulares de actinobactérias foi expressa em termos relativos ao crescimento nos controles negativos, de acordo com a equação:

$$\text{IRC (\%)} = 1 - \frac{\text{DOE}_{tx} - \text{DOE}_{t0}}{\text{DOC}_{tx} - \text{DOC}_{t0}}$$

Nesta equação IRC indicou a inibição relativa do crescimento; DOE e DOC, representam a D.O. na presença do extrato de actinobactérias e nos controles negativos, respectivamente, e os subscritos tx e to, os tempos de avaliação da DO em fase exponencial e no tempo zero.

3.6 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS E ORGÂNICOS DE CULTURAS DE ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias foram crescidas em 500 mL de meio ISP2 TF50 a 160 rpm por 48 h até uma D.O. >2,5. As culturas foram homogeneizadas com 20 mL de metanol e 50 mL de clorofórmio e as fases orgânicas e aquosas separadas em funil de decantação. O conteúdo orgânico obtido com a destilação do clorofórmio foi concentrado em um evaporador rotativo a 40°C (OEM, China). A fase aquosa foi liofilizada.

O extrato orgânico foi pesado, diluído em DMSO até 20 mg ml⁻¹ e armazenado a -20°C, até avaliação.

3.7 AVALIAÇÃO DA CI₅₀ DOS EXTRATOS AQUOSOS E ORGÂNICOS DE CULTURAS DE ACTINOBACTÉRIAS

A concentração inibitória média (CI₅₀) dos extratos orgânicos e aquosos foi determinada através de leituras de D.O. em microplacas empregado na avaliação dos extratos extracelulares. Resumidamente, alíquotas de 180 µL meio de cultura previamente inoculados com os organismos alvos foram adicionadas aos poços. Os extratos orgânicos (20 mg mL⁻¹) foram seriadamente diluídos em fatores de 4 vezes. Alíquotas de 20 µL destas diluições foram misturadas aos 180 µL adicionados previamente aos poços, de modo que as concentrações finais de extrato nos testes fossem de 100, 25, 6,25, 1,56, 0,39 µg mL⁻¹. Controles foram utilizados conforme descrito na seção 4.5. A CI₅₀ foi

estabelecida em relação ao controle inoculado com os organismos alvos misturados aos extratos orgânicos de meios de cultura não inoculados com as actinobactérias.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Médias de IRC entre os extratos de diferentes tempos de incubação de cada uma das actinobactérias foram comparadas pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

As CI_{50} das frações orgânicas das culturas dos diferentes isolados antagonistas foram comparadas estatisticamente pelo mesmo teste ($p < 0,05$), para cada organismo alvo separadamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1. SELEÇÃO DO MEIO DE CULTURA E VARIAÇÕES NO PH APÓS CRESCIMENTO DAS ACTINOBACTÉRIAS NOS MEIOS COM TF 50 mM e 100 mM.

Dos três meios de cultura testados, somente o ISP2 permitiu o crescimento de todas as bactérias avaliadas, sendo, portanto, selecionado para as etapas experimentais deste estudo. A utilização de um meio comum ao crescimento de todas as bactérias foi importante para permitir a comparação direta do potencial antimicrobiano entre os isolados incluídos neste estudo.

Outro aspecto importante a ser considerado na análise da atividade antimicrobiana deste trabalho foi a avaliação do poder tamponante do pH do meio ISP2 durante o cultivo, pois a diminuição do pH pode resultar na inibição do crescimento dos micro-organismos alvos. Este fato pode levar a uma interpretação errônea da inibição como uma resposta à produção de metabólitos secundários (ZHAO *et al.*, 2011).

No meio ISP2 não tamponado, o crescimento microbiano em meio líquido por 24 a 48 h provocou a redução do pH em cerca de 1,0 unidade quando foram utilizados os isolados TC105, T42 e TCX. O pH, no entanto, foi mantido estável no meio em que foram cultivados o TC70 e TC44. Por outro lado, quando o ISP2 foi preparado em tampão fosfato 50 mM, apenas TC42 reduziu o pH do meio. Esta redução, no entanto, foi suprimida quando o tampão utilizado foi o fosfato 100 mM.

4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM EXTRATOS DE DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO.

O filtrado extracelular da cultura de TC105 apresentou inibição do crescimento de *S. cerevisiae* e *B. cereus*, utilizados como alvos. Assim, o início da atividade contra *S. cerevisiae* foi observado após 700 min de incubação com o isolado TC105 (Figura 1A), enquanto para *B. cereus* a inibição aconteceu em um tempo menor, aproximadamente aos 550 min do teste, como mostrado na Figura 1B.

Os sobrenadantes dos meios fermentados por TC44 e TC42 apresentaram atividade contra *B. cereus*, mas não contra *Xanthomonas campestris* e *Saccharomyces cerevisiae*. De acordo com a Figura 2, a inibição a *Bacillus cereus* se iniciou em torno dos 500 e 800 min, respectivamente. O efeito inibitório de TC42, no entanto, foi dependente do tampão utilizado no meio de cultura, já que, diferentemente do ISP2 TF50 mM, filtrados derivados de culturas crescidas no meio ISP2 TF 100mM não inibiram o crescimento de *B. cereus* (Figura 3). Esta observação é importante, já que a atividade de TC42 pode em grande parte ser relacionada à queda de pH, e não a metabólitos secundários. Estes resultados estão de acordo com RASANAYAGAM e JEFFRIES (1992) que indicaram que a forte inibição de *Pythium ultimum* por diversos fungos ectomicorrízicos observada em meio de cultivo não tamponado foi suprimida em meio tamponado. Estes autores sugerem que a acidificação do meio e não a ação de metabólitos secundários seja o principal efeito inibidor do crescimento deste fitopatógeno. O efeito positivo do uso de meios de cultura tamponados sobre a longevidade de células microbianas também foi claramente comprovado para leveduras (MURAKAMI *et al.*, 2011).

Figura 1. Crescimento relativo de *Saccharomyces cerevisiae* (A) e *Bacillus cereus* (B) cultivados na presença de extratos extracelulares do isolado TC105 coletados em tempos crescentes de incubação. Médias de crescimento relativo seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Barras de erros indicam ± 1 D.P.

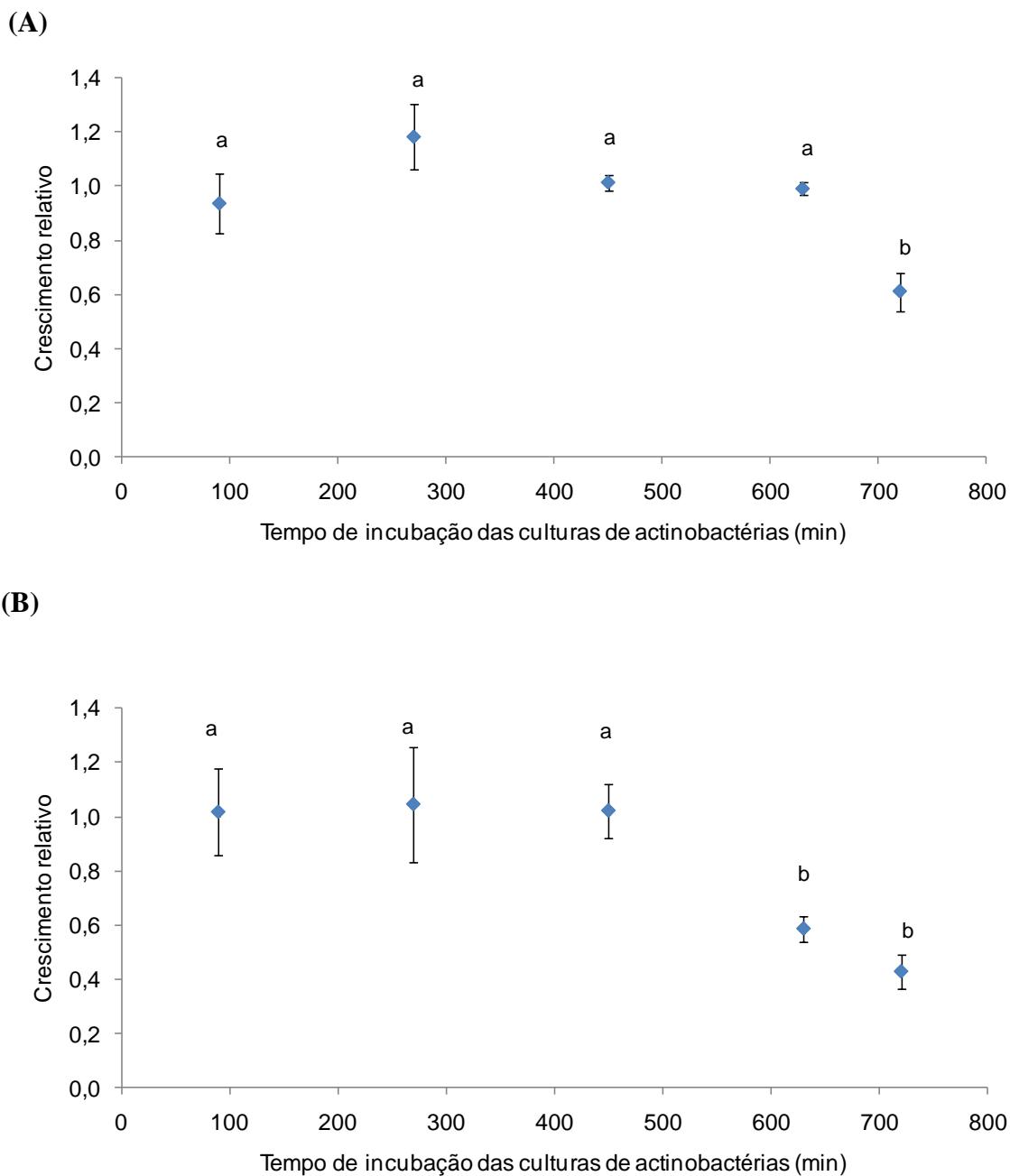
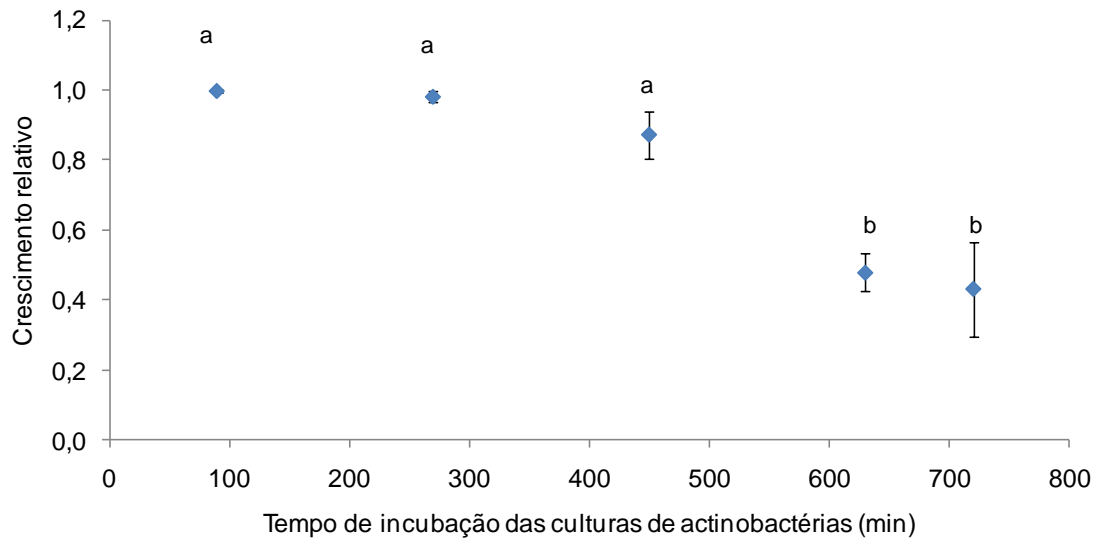
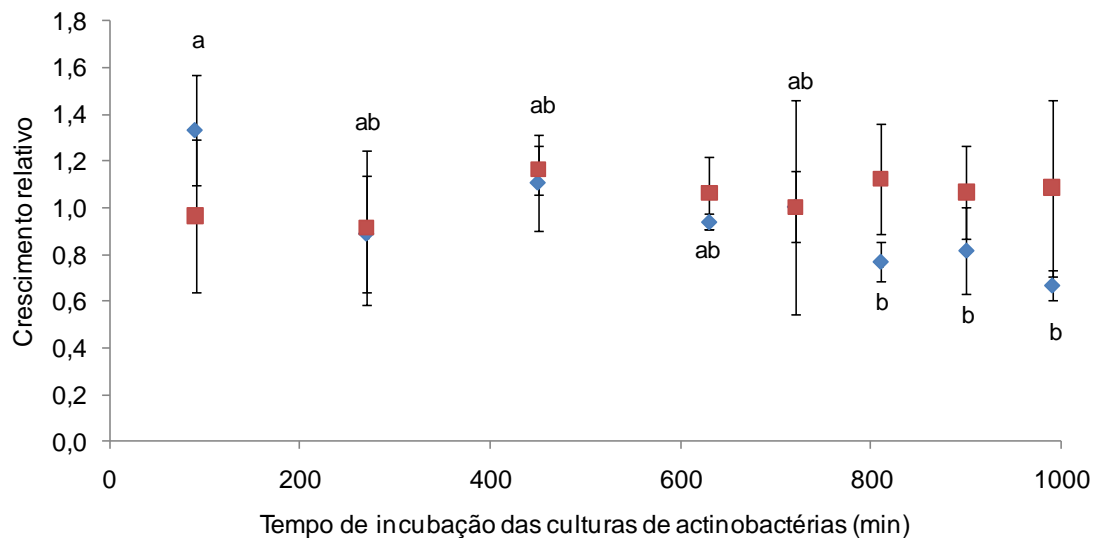


Figura 2. Crescimento relativo de *Bacillus cereus* cultivados na presença de extratos extracelulares do isolado TC44 obtidos em tempos crescentes de incubação. Médias de crescimento relativo seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Barras de erros indicam ± 1 D.P.



Nas situações acima relatadas, foi observado que o início de atividade antimicrobiana coincidiu com o fim da fase exponencial das actinobacterias, de acordo com curva de crescimento, monitorada mediante densidade óptica das culturas. Estes resultados são condizentes com relatos anteriores de que a produção de compostos secundário bioativos ocorre especialmente em condições de estresse microbiano, como por exemplo, déficit nutricional, como os que ocorrem na fase estacionária (HECK, 2007; OCHI, 2007).

Figura 3. Crescimento relativo de *Bacillus cereus* cultivados na presença de extratos extracelulares do isolado TC42 obtidos em tempos crescentes de incubação. Símbolos azuis e vermelhos representam tratamentos com tampão fosfato de sódio com concentrações de 50 mM e 100 mM, respectivamente. Médias de crescimento relativo seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) nas comparações entre tempos de incubação no tratamento com tampão 50 mM. Não houve diferença entre os tempos de incubação quando tampão 100 mM foi empregado.



4.3 CI_{50} DE FASE ORGÂNICA E COMPARAÇÃO ENTRE ACTINOBACTÉRIAS QUANTO À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

Em relação à concentração inibitória média (CI_{50}), é interessante observar que não houve relação entre as atividades detectadas com os sobrenadantes dos meios fermentados filtrados e suas respectivas frações orgânicas. De fato, a maioria das actinobactérias não mostrou atividade nesses filtrados contra os organismos alvos, embora todas tenham apresentado frações orgânicas bioativas a concentrações muito baixas (CI_{50} entre 4 e 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$) contra *S. cerevisiae* (Figura 4) e baixas a altas (CI_{50} entre 10 e 140 $\mu\text{g ml}^{-1}$) contra *B. cereus* (Figura 5). De acordo com Cos et al. (2006), as atividades antimicrobianas relevantes de extratos estão associadas a CI_{50} menores que 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, e menores que 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, para compostos puros.

Apenas o extrato orgânico da actinobactéria TC42 apresentou atividade contra *X. campestris*, com uma CI_{50} média de 107 $\mu\text{g ml}^{-1}$. A menor sensibilidade de bactérias Gram negativas em comparação a eucariotos e bactérias Gram positivas à ação de drogas tem sido relatada (COS *et al.*, 2006).

É interessante ressaltar que o isolado TC42, com alta afiliação com *Pseudonocardia*, foi o mais ativo para todos os modelos alvos testados. No entanto, pelo fato de o efeito inibitório desta actinobactéria ter sido dependente do tamponamento utilizado no meio de cultura, a contribuição relativa da ação de metabólitos secundários e da acidificação do meio fermentado como mecanismos de controle do crescimento microbiano necessita ser quantificada.

Os isolados TC44 e TC105, além de não inibirem *X. campestris*, necessitaram de concentrações relativamente altas de suas frações orgânicas para inibir *B. cereus*. No entanto, estes isolados apresentaram potencial como fonte de compostos antimicrobianos contra o modelo eucarioto *S. cerevisiae* empregado neste estudo. A maior atividade destes dois isolados contra *S. cerevisiae*, comparativamente aos modelos bacterianos, pode constituir uma característica interessante, já que indicaria uma bioatividade contra alvos mais específicos. De acordo com Brodeur (2012), agentes de controle biológico com alta especificidade podem ser de grande relevância por permitirem o controle do fitopatógeno sem causar impactos a organismos não-alvos.

Figura 4. Concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano por extratos da fração orgânica de culturas de actinobactérias do solo utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae* V200 como organismo alvo. Barras de médias com mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Bonferroni a 5% de probabilidade.

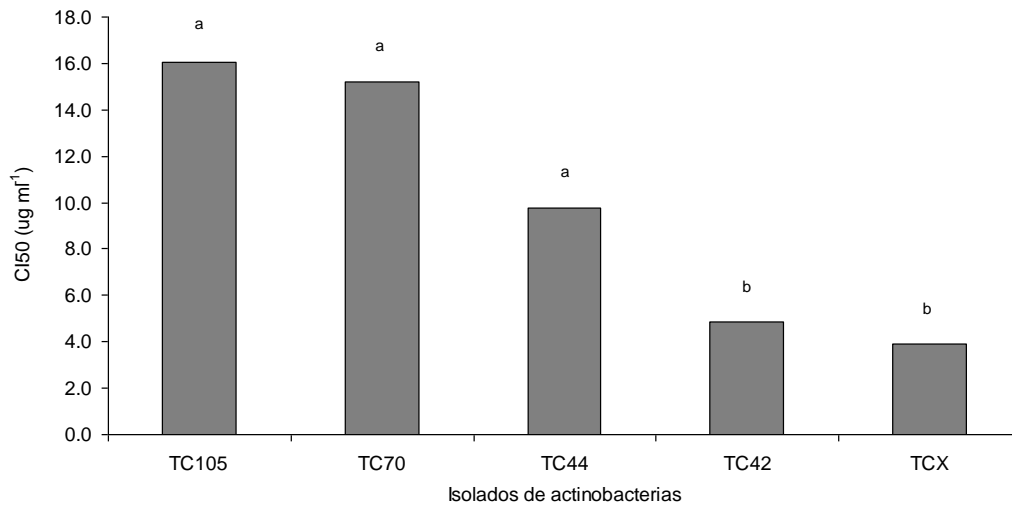
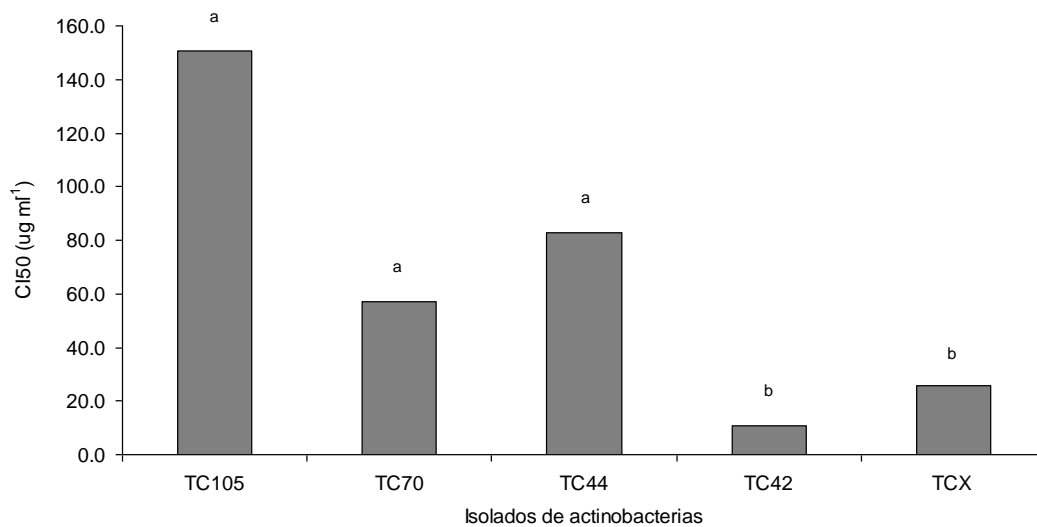


Figura 5. Concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano por extratos da fração orgânica de culturas de actinobactérias do solo utilizando-se *Bacillus cereus* ATCC 14579 como organismo alvo. Barras de médias com mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Bonferroni a 5% de probabilidade.



5 CONCLUSÕES

O tamponamento do meio ISP2, tradicionalmente utilizado para o cultivo de actinobactérias, permite reduzir a influência da acidificação meio pelo crescimento bacteriano sobre o controle de micro-organismos alvo.

A produção de compostos bioativos pela actinobactérias testadas no controle microbiana ocorre ao final exponencial do crescimento.

Todos os isolados testados apresentem alta atividade em suas frações orgânicas contra pelo menos um dos organismo alvo estudado, com destaque para os isolados TC42, afiliado a *Pseudonocardia*, e TC44, não afiliado a famílias previamente classificadas.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar o potencial dos isolados de actinobactérias em produzir novas substâncias antimicrobianas contra diferentes grupos de micro-organismos fitopatogênicos.
- Identificar os compostos nas das frações ativas dos isolados de actinobactérias e caracterizar os compostos químicos presentes nos metabólitos secundários ativos extraídos dos micro-organismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASOLKAR, R. N. *et al.* Arenimycin, an Antibiotic Effective Against Rifampin and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the Marine Actinomycete *Salinispora Arenicola*. *J. Antibiot.*, v. 63, n. 1, p. 37–39, 2010.

BARRETO, E. N. Avaliação do potencial antimicrobiano de actinobactérias pelas vias de NRPS e PKS-I. Universidade Tiradentes. Aracaju, Se – Brasil, p. 16, 2013.

BRODEUR, J. Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evolutionary Applications*, v.5, p. 470–480, 2012.

CAVALCANTE, A.C.S. Ampliação da diversidade de bactérias cultiváveis do solo pelo uso de técnicas simples de cultivo. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe.

CHATER, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bactéria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. v 361, p 761-798: 2006.

CLARDY, J.; FISCHBASCH, M.A.; WALSH, C.T. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*. 24: 1541-155, 2006.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant disease: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, p.4951-4959, 2005.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potencial of natural products: how to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 160, p. 290-302, 2006.

CUESTA, G. *et al.* Isolation and Identification of Actinomycetes from a Compost-amended Soil with Potential as Biocontrol Agents. *Journal of Environmental Management*, v. 95, p. S280-S284, 2012.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. New York: Springer-Verlag, 2003.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, v. 37, p. 189-216: 1989.

GUO, Zhi-Kai, Rui-Hua Jiaob, Hao-Fu Daia, Wen-Li Meia, Ren-Xiang Tan, Hui-Ming Ge. Actinotetraoses I –K: Tetrasaccharide Metabolites Produced by an Insect-Derived Actinobacteria, *Amycolatopsis* sp. HCa1. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*, 10, 296, 2013.

HECK, M. G. Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. Linhagem 2S. (Dissertação: Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HOLT, J. G. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9ed Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787, 1994.

HUANG, X. L. *et al.* Isolation and Bioactivity of Endophytic Filamentous Actinobacteria from Tropical Medicinal Plants. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 41, p. 9855-9864, 2012.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, v. 180, n. 18, p. 4765 – 4774, 1998.

JOSEPH, S.J.; HUGENHOLTZ, P.; SANGWAN, P.; OSBORNE, C.A.; JANSSEN, P.H. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 12, p. 7210 – 7215, 2003.

McCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Methods for studying the ecology of actinomycetes. In: GRIGOROVA, R.; NORRIS, J. R. *Methods in Microbiology: Techniques in microbial ecology*. v. 22. London: Academic, 1990.

MOHANDAS, S. *et al.* Guava (*Psidium guajava* L.) rhizosphere *Glomus mosseae* spores harbor actinomycetes with growth promoting and antifungal attributes. *Scientia Horticulturae*, v. 150, p. 371–376, 2013.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MURAKAMI, C.J.; WALL, V.; BASISTY, N.; KAEBERLEIN, M. Composition and Acidification of the Culture Medium Influences Chronological Aging Similarly in Vineyard and Laboratory Yeast. *PLoS ONE* 6(9): e24530, 2011.

OCHI, K. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. v 71, p 1383-1386: 2007.

PANDEY, B.; GHIMIRE, P.; AGARWAL, V.P. Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. *J. Biol. Sci.*, 23: 44-53, 2004.

PARSLEY, L.C.; LINNEMAN, J.; GOODE, A.M.; BECKLUND, K.; GEORGE, I.; GOODMAN, R.M.; LOPANIK, N.B.; LILES, M.R. Polyketide synthetase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil Acidobacteria. *FEMS Microbiol Ecology*, v.78, p.176-187, 2011.

PRIDHAM, T. G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L. A.; HESSELTINE, C. W.; BENECICT, R. G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiotics Annual*, New York, p. 947-953. 1957.

RASANAYAGAM, S.; JEFFRIES, P. Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research*, v. 96, p.971-976, 1992.

SANDVEN P, Lassen J. Importance of selective media for recovery of yeasts from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 11, p. 3731-3732.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITIS.; TAYLOR, W. C. Lansai A–D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1. *Tetrahedron*. Vol. 64, p. 7583–7586, 2008.

VENTURA, M. *et al.* Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v.71 n.3 p.495-548, 2007.

VICENTE, J. *et al.* Biodiversity of actinomycetes associated with Caribbean sponges and their potential for natural product discovery. *Mar. Biotechnol.*, 2013.

VINING, L. C. Secondary metabolism. In: REHM, H. J.; REED, G. *Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes*. V 4, p19-38: 1986.

ZHAO, K. *et al.* The Diversity and Anti-Microbial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from Medicinal Plants in Panxi Plateau, China. *Curr. Microbiol*, v. 62, p. 182–190, 2011

ZHANG, Xiao-Yong, Fei He, Guang-Hua Wang, Jie Bao, Xin-Ya Xu, Shu-Hua Qi. Diversity and antibacterial activity of culturable actinobacteria isolated from five species of the South China Sea gorgonian corals. *World J Microbiol Biotechnol*, 29,1107,1116, 2013.