



Avaliação da atividade antagonista de actinomicetos acidófilos

RESUMO

Bruna Finardi

b_finardi@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

Erika Izumi

erikaizumi@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

Gabriela Cristina de Andrade

gabriela_c.andrade@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

Francielly Balestrin de Souza

fbalestrin@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

Bárbara Cristina Lopes

lopesb@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

OBJETIVO: O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de isolados bacterianos obtidos no Lago Itaipu frente a alguns patógenos de interesse agrônômico e clínico. **MÉTODOS:** Dois protocolos distintos foram seguidos: difusão em ágar, para leveduras e bactérias, e o teste de crescimento radial em placa, para atividade antifúngica em fungos filamentosos. **RESULTADOS:** Foram obtidos 17 isolados provenientes de amostras de água do lago Itaipu, sendo 9 deles halófilos moderados e 8 isolados neutrófilos. Não foi possível o isolamento de bactérias acidófilas nas condições testadas. Os resultados da difusão em ágar demonstraram que 4 dos 17 isolados inibiram o crescimento de *B. cereus*. Com relação ao teste de atividade antifúngica, 5 dos isolados mostraram-se efetivos ao inibir *F. graminearum*, sendo 4 deles constituídos pelos halófilos moderados. Contra *T. rubrum* os resultados indicaram pelo menos 1 isolado com atividade inibitória. **CONCLUSÕES:** A descoberta de novas moléculas ativas depende de exaustivos testes visando triar a diversidade microbiana dos diferentes ambientes, sendo o lago Itaipu pouco estudado neste sentido. O estudo mostrou que tal ambiente, que recebe água de rios que drenam boa parte do oeste do país, pode apresentar significativa quantidade de isolados promissores quanto à produção de moléculas de interesse. Mais estudos acerca da identificação das amostras e das moléculas por eles produzidas serão conduzidos.

PALAVRAS-CHAVE: Actinomicetos. Lago Itaipu. Antagonismo. Halófilos. Antimicrobianos.

INTRODUÇÃO

Actinomicetos são bactérias geralmente gram-positivas cujo DNA apresenta grande quantidade de guanina e citosina (Taniguchi *et al*, 2014). Além disso são caracterizados por sua capacidade de formar hifas em seu desenvolvimento. Embora sejam encontrados nos mais diversos habitats, grande parte é proveniente do solo (Groth *et al*, 1999).

Esta conclusão baseia-se no fato de que eles estão completamente adaptados para viver no solo, estruturas especializadas tais como as hifas, são extremamente funcionais na penetração e colonização do substrato (McCarthy *et al*, 1992). É possível que sua ocorrência em ambientes aquáticos esteja relacionada com a lixiviação do solo. Esta hipótese é apoiada pelo fato de a diversidade do solo ser a mesma do ambiente aquático (Araújo, 1998).

São microrganismos com metabolismo diversificado, sendo capazes de utilizar fontes variadas de carbono e energia. Assim, eles podem ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou fototróficos (Kennedy, 1999). A maioria é aeróbia, mas existem actinomicetos anaeróbios ou anaeróbios facultativos. Crescem preferencialmente em solos de pH neutro à alcalino, embora muitos também cresçam em solos ácidos (Pereira *et al*, 2013).

Eles sintetizam compostos químicos como tiamina, riboflavina, compostos contendo ferro e coenzimas que podem promover ou inibir o crescimento de outros organismos (Pereira *et al*, 2013).

MÉTODOS

Coleta das amostras de água

Amostras de água foram coletadas de diferentes regiões do lago Itaipu, na região do Refúgio Biológico de Santa Helena. Os locais de coleta incluíram a borda do lago, região de macrófitas e o canal, em frascos esterilizados.

Obtenção dos isolados microbianos

Para a obtenção de actinomicetos foi utilizado o meio de cultivo Actinomycete Isolation Agar (HIMEDIA), suplementado com 0,5% de glicerol. O pH do meio foi ajustado de acordo com o grupo microbiano a ser isolado e crescentes concentrações de NaCl para halófilos (5%, 7%, 10%). Alíquotas de água do lago foram espalhadas sobre as placas contendo os meios de cultivo, com o auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas por aproximadamente 14 dias, a 28°C. As colônias resultantes do crescimento foram repicadas para novas placas, avaliadas quanto à coloração de Gram e armazenadas a 4°C.

Microrganismos para testes

Candida albicans (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 28707), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 06633), *Trichophyton rubrum* (ATCC 28189). *Rhodotorula* e *Fusarium graminearum* foram ambos isolados de plantas e fornecidos gentilmente pela UFPR Palotina.

Teste antimicrobiano de difusão

As leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Rhodotorula* foram cultivadas em caldo sabouraud por 48h a 37°C, exceto pela última a 28°C. As bactérias *B. subtilis* e *B. cereus* foram cultivadas em caldo nutriente por 48h a 28°C. Após a incubação, todos os microrganismos-teste foram diluídos em água destilada esterilizada segundo a escala 1 de McFarland. 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 isolados obtidos das amostras de água, estes foram cultivados previamente em tubos de ensaio, em meio líquido ISP-4, por 7 dias a 28°C. Após este período, alíquotas de 20 µL do sobrenadante foram colocadas em poços perfurados no ágar onde os microrganismos-teste foram semeados. As placas foram incubadas por 48h de acordo com a temperatura ideal de incubação de cada microrganismo. A inibição foi visualizada através da formação de um halo ao redor do poço. O diâmetro do halo (dh) foi medido em milímetros, assim como o diâmetro do poço (dp), e um índice da zona de inibição (izi) foi calculada através da razão $izi=dh/dp$.

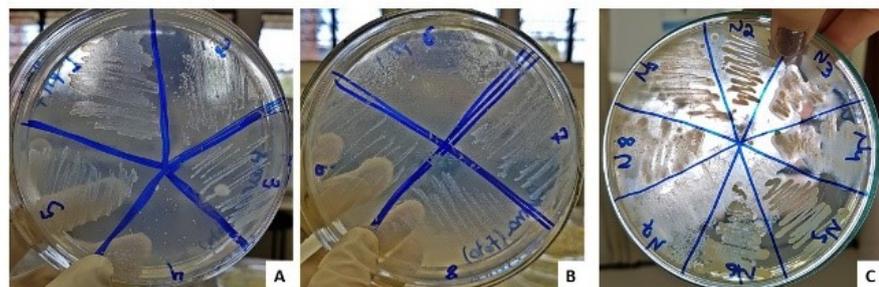
Teste antimicrobiano de crescimento radial

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos locais de coleta, um maior número de isolados foi proveniente das coletas da borda do lago, seguida da região de macrófitas. Foram obtidos 9 isolados que cresceram sob pressão osmótica por NaCl, considerados halófilos moderados e denominados como isolados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Em meio de cultivo preparado em pH 7 foram 8 isolados denominados neutrófilos N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7 e N8 (Fig. 1). Não foi obtido nenhum isolado acidófilo em pH 5, 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 ácidas. A água do lago, em todas as coletas, apresentou pH 6.

Figura 1 - Morfotipos dos microrganismos presentes na água do lago.



Legenda: A, B: Crescimento de halófilos; C: crescimento de neutrófilos.

Os isolados halófilos moderados 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 os microrganismos halófilos, ao contrário da maioria dos que cresceram em pH neutro, não produziram pigmentos. Além disso, os halófilos necessitaram de um período mais longo de incubação.

Os isolados foram avaliados quanto sua resposta à coloração de Gram, e todos se apresentaram como Gram positivos. Ainda assim, não podemos afirmar

que todos os isolados são actinomicetos, pois seria necessária também a realização de microcultivos para observação da formação filamentosa e reprodutiva, ou então sequenciamento de regiões conservadas. Entretanto, vários isolados apresentaram crescimento das colônias com característica típica de actinomicetos: crescimento lento, formas irregulares, superfícies rugosas ou secas, de aspecto pulverulento.

Com relação à atividade antimicrobiana observou-se atividade de inibição contra *B. cereus* pelos halófilos 1, 3, 5 e 7. Através do cálculo do índice da zona de inibição podemos verificar que o halófilo 5 apresentou maior atividade antagonista, seguido pelos halófilos 3 e 7, e por último o halófilo 1 (Tab. 1). O *B. cereus* é um conhecido causador de intoxicação alimentar, podendo causar náusea, vômito e diarreia. O estudo de substâncias inibidoras contra microrganismos contaminantes de alimentos pode levar a descoberta de novos conservantes alimentares.

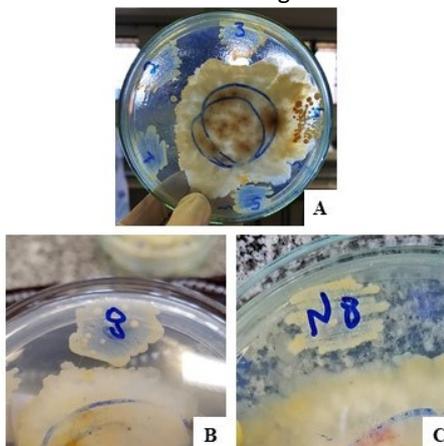
Tabela 1 - Resultados da atividade inibitória constatada no teste de difusão em ágar contra *B. cereus*.

Atividade inibitória contra <i>B. cereus</i>			
Amostra	Diâmetro do poço	Diâmetro do halo de inibição	Índice da zona de inibição
1	6 mm	10 mm	1,66
3	6 mm	11 mm	1,83
5	5 mm	10 mm	2,00
7	6 mm	11 mm	1,83

Fonte: Autoria própria (2017)

Os testes realizados contra *T. rubrum* demonstraram que o isolado halófilo 9 apresentou propriedades inibidoras. Este resultado se mostrou promissor, pois *T. rubrum* é o principal causador de micose de unha e pé-de-atleta, e novas moléculas que possam inibir seu crescimento poderia contribuir para um novo tratamento mais eficaz e rápido do que os atuais. Contra *F. graminearum*, fungo causador de patologias em cultivos como trigo, observou-se um total de cinco isolados antagonísticos, sendo eles um microrganismo neutrófilo N8 e quatro halófilos 1, 2, 3 e 5 (Fig.2).

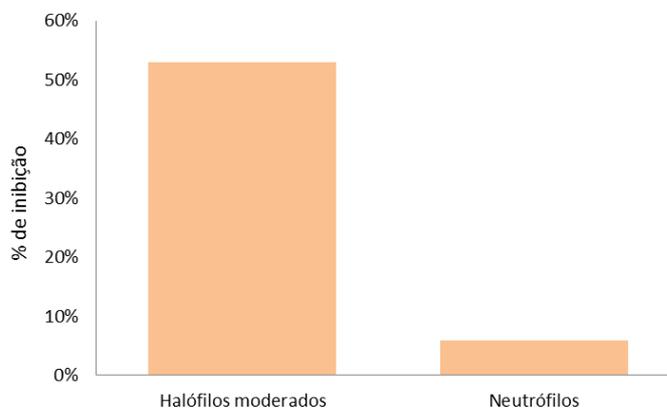
Figura 2 - Amostras com atividade antagonística contra *F. graminearum*.



Legenda: A, B : Halófilos Moderados (1, 2, 3, 5, 8); C: Neutrófilo (N8).

Os resultados deste estudo mostraram que o grupo dos halofílicos apresentou maior atividade inibidora contra os microrganismos testados, com mais de 50% de isolados demonstrando antagonismo (Graf.1).

Gráfico 1.- Porcentagem da atividade inibitória total encontrada.



CONCLUSÕES

A descoberta de novas moléculas ativas depende de exaustivos testes visando triar a diversidade microbiana dos diferentes ambientes, sendo o lago de Itaipu pouco estudado neste sentido. O estudo mostrou que tal ambiente, que recebe água de rios que drenam boa parte do oeste do país, pode apresentar uma significativa quantidade de isolados promissores quanto à produção de moléculas de interesse. Mais estudos acerca da identificação das amostras e das moléculas por eles produzidas serão conduzidos.

Evaluation of antagonistic activity of acidophilic actinomycetes

ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of bacterial isolates obtained from Itaipu Lake against some pathogens of agronomic and clinical interest. **METHODS:** Two distinct protocols were used: agar diffusion test for yeasts and bacteria, and radial plate growth test for antifungal activity against filamentous fungi. **RESULTS:** 17 isolates were obtained from water samples of which 9 were moderate halophiles and 8 were neutrophilic. It was not possible to isolate acidophiles as a result of our sampling procedures. Diffusion agar test demonstrated that 4 of the 17 isolates inhibited the growth of *B. cereus*. Against filamentous fungi, 5 isolates were effective when inhibiting *F. graminearum*, of which 4 were formed by moderate halophiles. *T. rubrum* was inhibited by 1 isolate. **CONCLUSION:** The discovery of new active compounds depends on exhaustive tests to screen the microbial diversity present in different environments, and Itaipu Lake has not been investigated in detail. This study showed that this environment, which receives water from rivers that drain a large territory on the west region of Brazil, may harbour a large amount of promising microbial isolates able to produce interesting compounds. Further studies on the identification of the samples and compounds will be performed.

KEYWORDS: Actinomycetes. Itaipu Lake. Antagonism. Halophiles. Antimicrobials.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, J.M. Estratégias para o isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 351-367.

GROTH, I. et al. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of microbiological methods*, Amsterdam, v. 36, p. 115-122, 1999.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agrosystems. *Agriculture ecosystems & environment*, Amsterdam, v.74, p. 65-76, 1999.

MCCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environmental – a review. *Gene*, Viena, v. 115, p. 189-192, 1992.

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.

TANIGUCHI, Juliana Gonçalves et al. Produção de moléculas bioativas por fermentação em estado sólido utilizando novos actinomicetos e caracterização parcial dos principais compostos. *Trends in Bioscience and Biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 4-7, 2014.

Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/141231>>. Acesso em 12/07/2017.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar: FINARDI, B. et al. Avaliação da atividade antagonista de actinomicetos acidófilos. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. Anais eletrônicos... Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Bruna Finardi

Avenida Brasil, número 436, Bairro Baixada Amarela, Santa Helena, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

