

Avaliação do potencial antimicrobiano de actinomicetos isolados de processo de compostagem contra acinetobactérias multirresistentes.

Ana Bárbara Barth Hahn ¹, Sueli Teresinha Van Der Sand ²

¹ Acadêmica do curso de graduação em Ciências Biológicas, UFRGS.

² Professora do Departamento de Microbiologia e membro do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Endereço para correspondência: Sarmento Leite, 500

Porto Alegre, RS, Brasil

CEP: 90050-170

Contato: anabarbarahahn@hotmail.com; svands@ufrgs.br

Resumo: Actinomicetos são bactérias Gram positivas, com alto conteúdo GC, filamentosas e sabidamente produtoras de compostos de metabolismo secundário com potencial antimicrobiano. Os actinomicetos utilizados nesse trabalho foram isolados de uma leira de compostagem, montada e monitorada, na Usina de triagem da Lomba do Pinheiro em Porto Alegre. Ensaios testando a produção de metabólitos secundários – antibióticos- foram realizados contra acinetobactérias multirresistentes isoladas de surtos de infecções hospitalares na UTI do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram testados 84 isolados de actinomicetos contra quatro cepas de acinetobactérias. No ensaio de dupla camada, foram observados resultados positivos contra duas cepas: vinte por cento dos actinomicetos apresentaram ação bactericida contra a cepa 157 e 12% bacteriostática, enquanto que para a cepa 200 - 11% dos isolados tiveram ação bactericida e 15% bacteriostática. Os isolados com melhores resultados foram identificados quanto a gêneros e selecionados para ensaios de crescimento e produção dos metabólitos em cultura submersa. Os resultados obtidos com os extratos brutos das culturas de crescimento submerso, nas condições testadas, não mostraram a atividade antimicrobiana obtida nos ensaios de dupla camada.

Palavras-chave: actinomicetos, produção de antibióticos e acinetobactérias multirresistentes.

Abstract: Actinomycetes are Gram-positive filamentous bacteria with high GC content and known producers of secondary metabolites compounds with antimicrobial activity. The actinomycetes used in this study were isolated from a composting pile, built and monitored in Plant screening of Lomba do Pinheiro in Porto Alegre city. Trials testing the production of secondary metabolites – antibiotics - were performed against multi-resistant *Acinetobacter* isolates from outbreaks of nosocomial infections in the ICU of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. We tested 84 isolates of actinomycetes against four strains of *Acinetobacter*. In the double-layer assay, positive results were observed with two strains of actinomycetes that showed 20% bactericidal activity against strain 157 and 12% bacteriostatic activity, whereas against strain 200, 11% of isolates had bactericide and 15% bacteriostatic activity. The isolates that showed the best results had their genera identified and were selected for testing the growth and metabolite production in submerged culture. The results obtained with crude extracts of cultures, under the tested conditions, showed no antimicrobial activity like that achieved in the double-layer assay.

Keywords: actinomycetes, produce antibiotics and multidrug-resistant *Acinetobacter*.

1. Introdução:

A compostagem é um processo natural de decomposição biológica, que além de evitar o acúmulo de resíduos sólidos urbanos em aterros, devolve a terra os nutrientes dos quais ela necessita. Este processo é realizado por bactérias, como os actinomicetos, e fungos e tem como resultado um composto estável que pode ser usado como fertilizante (Oliveira, 2003). Actinomicetos são bactérias Gram positivas que apresentam no seu genoma altas concentrações de guanina e citosina, são principalmente aeróbios e apresentam grande diversidade fisiológica e metabólica. Microscopicamente apresentam aspecto filamentosos, estão presentes em uma grande diversidade de habitats e são capazes de produzir metabólitos secundários usados na produção de pigmentos, enzimas extracelulares, antibióticos entre outros. Os gêneros de actinomicetos predominantemente isolados da compostagem de resíduos sólidos urbanos incluem *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Micromonospora* (Tuomela et al., 2000). O gênero *Streptomyces* destaca-se pela produção de antibióticos, pois são responsáveis pela produção de cerca de 75% desses fármacos comercialmente usados em humanos, animais e na agricultura (Miyadoh, 1993). O uso descontrolado de

antibióticos ao redor do planeta é um problema a ser resolvido, pois através disso, muitas cepas de bactérias tornaram-se resistentes a muitas classes de antimicrobianos. Durante o último século, antibióticos produzidos por microrganismos têm, e continuarão a desempenhar um significativo papel no tratamento de doenças infecciosas. No entanto, com o aumento do uso de antibióticos muitas linhagens patogênicas têm sido selecionadas e apresentam elevados níveis de resistência aos antimicrobianos existentes (Penesyán, *et al* 2009). É inquestionável a necessidade de que novas drogas sejam descobertas e estudadas como fonte alternativa de tratamento de infecções que causadas por microorganismos resistentes que levam a mortes e diminuição da qualidade de vida da população em geral e, principalmente, de imunocomprometidos. Para cobrir a demanda por novos componentes farmacêuticos e para combater os patógenos resistentes a antibióticos, pesquisadores têm buscado novos organismos em ambientes não usuais (Ramesh, *et al* 2009). *Acinetobacter* spp. emergiu como um patógeno nosocomial importante em muitas partes do mundo, as infecções são difíceis de tratar em consequência de altos níveis de resistência a muitos antimicrobianos (Paterson, 2006). Assim, o principal problema em unidades de terapia intensiva (UTIs) brasileiras é a emergência de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose (BGNNFG) com sensibilidade antimicrobiana diminuída, tornando-se constante desafio para os profissionais da área da saúde. Nesse contexto, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp vêm adquirindo importância como agentes de infecções hospitalares devido a crescente resistência aos antimicrobianos (Laranjeira, *et al* 2010). O objetivo desse trabalho foi identificar actinomicetos produtores de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano.

2. Materiais e métodos:

2.1 Obtenção dos isolados:

As amostras de actinomicetos analisadas foram coletadas de uma leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (RSU) acrescido de lodo ativado, da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro, do Departamento Municipal de Limpeza Urbana (DMLU) de Porto Alegre. Essas foram coletadas de diferentes pontos da leira, homogêneas para então serem retiradas 10g de composto, a essa amostra foram adicionados 90mL de água estéril. Dessa mistura foram preparadas as diluições e realizado o esgotamento. Outrossim, as cepas de acinetobactérias multirresistentes

foram doadas pelo Dr. Afonso Barth da Faculdade de Farmácia/UFRGS. As cepas de *Acinetobacter* são oriundas de infecções ocorridas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2.2 Recuperação das amostras congeladas:

Alíquotas de 100µL do isolado armazenado em glicerol 30% foram semeadas em ágar amido caseína (ACA- amido 1%, caseína 0,03%, KNO₃ 0,2%, NaCl 0,2%, K₂HPO₄ 0,2%, MgSO₄ 0,005%, FeSO₄ 0,001% e ágar 1,5%) através da técnica de espalhamento em superfície com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 30°C por 7 dias. Depois de isoladas as amostras foram armazenadas em ACA inclinado. Já, as amostras de acinetobactérias foram mantidas em ágar tripticase de soja (TSA).

2.3 Identificação morfológica das colônias em nível de gênero:

As análises das características morfológicas foram realizadas pela técnica de microcultivo conforme Holt *et al.* (1989). As placas de microcultivo foram montadas em placas de Petri de vidro contendo dois palitos que sustentavam uma lâmina de vidro e em uma das extremidades em pedaço de algodão. Com o auxílio de uma micropipeta foi adicionado 300 µL de ACA e depois desse ter solidificado, foi realizado o inóculo dos actinomicetos a serem identificados utilizando uma agulha estéril para inoculação traçando uma reta transversal sobre o meio de cultura. Água estéril foi adicionada no algodão para formação de câmara úmida. As placas foram incubadas a 30°C por 7 dias e a partir do quinto começou-se a observar as características como ramificação do micélio, formação de micélio aéreo, fragmentação e formação de estruturas reprodutivas. A observação foi feita em microscópio óptico com aumento de 400X.

2.4 Técnica de antibiograma ou difusão em disco:

Esse teste de sensibilidade/resistência foi realizado com as quatro amostras de acinetobactérias. Em placas de ágar Müller-Hinton (rico em proteínas e carboidratos, fornece o substrato ideal para o desenvolvimento e crescimento de bactérias de interesse clínico). Utilizando a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) por comparação visual, as bactérias foram semeadas em todo ágar em estrias com rotações a cada 60°. Os antibióticos testados foram: CIP = ciprofloxacina, CLO = clorafenicol, GEN = gentamicina, NIT = nitrofurantoína, CRO = ceftriaxona, CFO = cefoxitina, CFL = cefalotina, IMP = imipenem, AMC = amoxicilina + ácido clavulâmico, EST =

estreptomicina, TET = tetraciclina, NOR = norfloxacina, SUT = sulfazotrim, VAN = vancomicina, ERI = eritromicina, AMI = amicacina, PEN = penicilina. Com o auxílio de uma pinça estéril, os discos de antibióticos foram distribuídos sobre a placa guardando uma distância de 24 mm de centro a centro. As placas foram incubadas a 37°C por 18-24 horas e depois os halos de inibição foram medidos utilizando como referência para resistência a antibióticos a tabela CLSI/2007.

2.5 Atividade antimicrobiana dos isolados pelo método das picadas:

Os 84 actinomicetos selecionados foram inoculados em duplicata em meio ACA com o auxílio de uma agulha estéril num ângulo de 90° e incubados a 30°C por sete dias. Após o crescimento, verteu-se uma sobrecamada que continha 9 mL de ágar Müller-Hinton misturado a 1 ml de cultura da célula-alvo com uma concentração de aproximadamente 3×10^8 células/mL (escala de McFarlan). Essa placa foi incubada a 37 °C por 24 horas e os halos de inibição ao redor dos organismos produtores de substâncias bioativas eram avaliados — sendo que nesse ensaio era somente avaliada a presença ou ausência de halo.

2.6 Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em poço:

Inicialmente foi realizado um pré-inóculo de 50 mL de meio AC com os actinomicetos testados, esses foram incubados a 30°C sob agitação constante de 150 rpm, por 48 horas. Então, foram retirados 5 mL do pré-inóculo e re-inoculado em 50 mL de meio AC incubado nas condições descritas acima por um período de cinco dias. A cada 24 horas eram coletadas amostras e estas eram centrifugadas, o sobrenadante era retirado e o pH determinado. Em placas de ágar Müller-Hinton, as bactérias testadas foram inoculadas seguindo a escala 0,5 de McFarlan, e poços com 9 mm de diâmetro eram confeccionados na placa. Os extratos eram colocados nos poços das placas inoculadas, e para que houvesse a difusão dos mesmos, as placas permaneciam 18 horas na geladeira antes de serem colocados na estufa a 37°C para o crescimento das bactérias multirresistentes. As placas permaneciam na estufa por 24 horas e posteriormente os halos de inibição eram verificados.

3.Resultados:

Das 92 amostras de actinomicetos removidos do glicerol, somente foram utilizadas 84 para o teste das picadas, os outros isolados tiveram problemas de crescimento e foram

descartados. As cepas multirresistentes de acinetobactérias foram testadas contra 17 antimicrobianos de uso clínico. Como mostra a tabela 1, todas as cepas cedidas mostraram ser resistentes as mais de duas classes de antimicrobianos. A cepa 415 mostrou-se resistente a 15 dos antimicrobianos testados e resistência intermediária contra 2; a cepa 157 mostrou-se resistente a 12, intermediária a 1 e sensível a 4 antimicrobianos; a cepa 200 mostrou-se resistente a 13 antimicrobianos, intermediária a 1 e sensível a 3; a cepa de número 1 mostrou-se resistente a 15 antibióticos e apresentou resistência intermediária a 2 antimicrobianos.

Tabela 1. Perfil de resistência de quatro isolados de *Acinetobacter* sp. frente a 17 antimicrobianos.

Nº	CIP	CLO	GEN	NIT	CRO	CFO	CFL	IMP	AMC	EST	TET	NOR	SUT	VAN	ERI	AMI	PEN
R<	15	12	12	14	13	14	14	13	13/19E	11	14	12	10	9	13	14	28E
415	12 R	- R	- R	- R	15 I	9 R	- R	- R	- R	- R	13 R	- R	- R	- R	19 I	15 R	- R
157	20 I	- R	- R	- R	- R	- R	10 R	- R	18 S	17 S	32 S	- R	- R	20 S	- R	- R	- R
200	20 I	- R	- R	- R	- R	- R	- R	- R	15 R	15 S	30 S	- R	- R	20 S	- R	- R	- R
1	10 R	- R	- R	- R	15 I	12 R	- R	8 R	- R	10 R	8 R	- R	- R	- R	18 I	11 R	- R

CIP = ciprofloxacina, CLO = clorafenicol, GEN = gentamicina, NIT = nitrofurantoína, CRO = ceftriaxona, CFO = cefoxitina,

CFL = cefalotina, IMP = imipenem, AMC = amoxicilina + ácido clavulâmico, EST = estreptomicina, TET = tetraciclina,

NOR = norfloxacina, SUT = sulfazotrim, VAN = vancomicina, ERI = eritromicina, AMI = amicacina, PEN = penicilina

*O diâmetro dos halos de inibição foram medidos em milímetros (mm).

Os 84 isolados de actinomicetos foram testados no ensaio de dupla camada, sendo esse teste realizado para a escolha daqueles isolados que produzissem alguma substância bactericida ou bacteriostática capaz de inibir o crescimento das acinetobactérias testadas. Os resultados deste ensaio podem ser observados nas figuras 1 e 2 que mostram a ação dos actinomicetos contra duas bactérias multirresistentes.

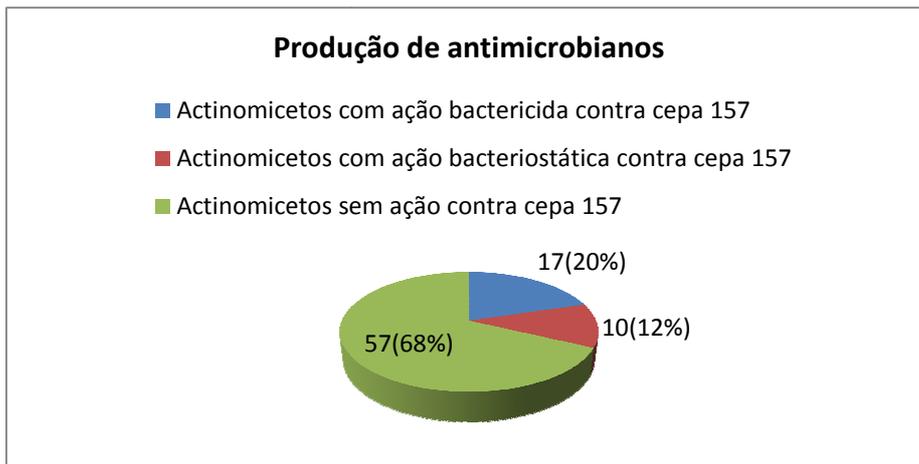


Figura 1. Actinomicetos com efeitos bactericida e bacteriostático contra cepa 157.

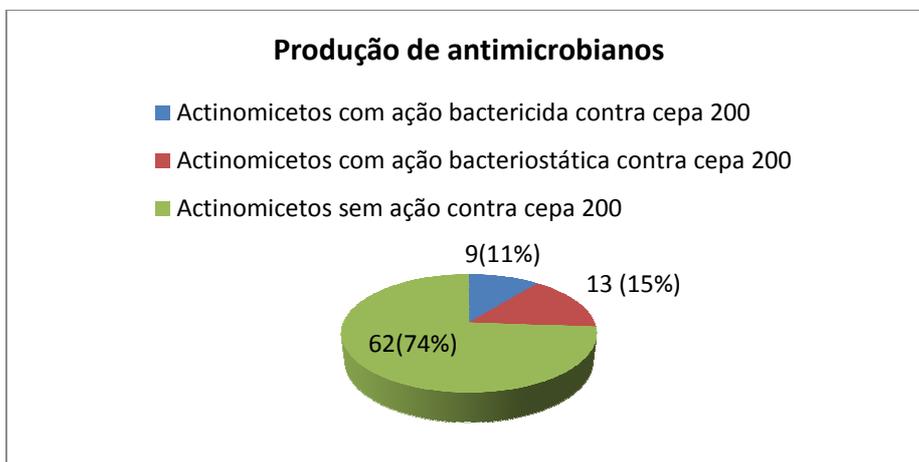


Figura 2. Actinomicetos com efeito bactericida e bacteriostático contra cepa 200.

Os resultados de atividade antimicrobiana mostraram uma atividade promissora contra as cepas 200 e 157. Nos ensaios de dupla camada contra a cepa 157, dos 84 isolados 17 tiveram ação bactericida e 10 ação bacteriostática. Semelhantes resultados foram observados contra a cepa 200, quando 9 actinomicetos apresentaram atividade bactericida e 13 ação bacteriostática. Apenas um isolado mostrou capacidade bacteriostática contra a cepa 1, a cepa 415 não foi inibida. Dos 84 isolados, 15 apresentaram atividade contra as duas cepas de *Acinetobacter* multirresistentes. Dos isolados com ação antimicrobiana, 8 actinomicetos foram bactericidas contras as duas cepas, 4 apresentaram atividade bactericida contra uma delas e bacteriostática contra outra e 3 foram bacteriostáticos para ambas. A seleção dos actinomicetos que seriam identificados, em nível de gênero, baseou-se nos resultados de atividade antimicrobiana

obtidos com o teste da dupla camada. Dentre estes isolados que tiveram atividade, foram priorizados aqueles com ação bactericida contra duas das cepas testadas, ou que, visivelmente tiveram um grande poder bactericida contra uma. Foram selecionados 13 isolados dos 84 actinomicetos testados inicialmente.

Conforme pode-se observar na tabela 2 houve um predomínio de isolados identificados como *Nocardia* baseados nas características morfológicas em meio de cultura. Nos testes de produção de extratos a partir de cultivo em cultura submersa não foi possível observar halo de inibição quando os extratos foram testados contra as cepas de acinetobactérias. Esses ensaios deverão ser repetidos utilizando diferentes condições de crescimento daquelas testadas neste momento.

Tabela 2. Tipo de ação e identificação dos isolados escolhidos para ensaio de difusão em poço.

Actinomicetos	Ação	Cepas	Gênero
113	Bactericida	157 e 200	<i>Streptomyces</i>
244	Bactericida	200	<i>Nocardia</i>
317	Bactericida	157 e 200	<i>Streptomyces</i>
319	Bactericida	157	<i>Nocardia</i>
324	Bactericida	157	<i>Nocardia</i>
325	Bactericida e bacteriostático	157; 200	<i>Nocardia</i>
328	Bactericida	157 e 200	<i>Nocardia</i>
329	Bactericida	157 e 200	<i>Nocardia</i>
330	Bactericida e bacteriostático	157; 200	<i>Streptomyces</i>
336	Bactericida	157 e 200	<i>Nocardia</i>
390	Bactericida	157 e 200	<i>Nocardia</i>
391	Bactericida	157 e 200	<i>Nocardia</i>
470	Bactericida	157 e 200	<i>Nocardia</i>

2. Discussão:

Actinomicetos são responsáveis por mais de 2/3 da produção total de antibióticos utilizados em uso humano, veterinário e agrícola. Membros do gênero *Streptomyces* contam com 70-80% da produção de metabólitos secundários, com contribuições

menores dos gêneros *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* e *Actinoplanes* (Challis & Hopwood 2003). Diferente do esperado, de actinomicetos isolados de compostagem é que neste trabalho a maioria dos actinomicetos produtores de antimicrobianos são do gênero *Nocardia* e uma menor prevalência do gênero *Streptomyces*. Resultados do nosso grupo de pesquisa mostram que dentre os gêneros produtores de metabólitos bioativos derivados de leira de compostagem o gênero *Streptomyces* representa 70% dos isolados produtores de compostos bioativos e o gênero *Nocardia* representa 20% dos com atividade antimicrobiana (Rodrigues, 2006). Outro fator importante a ser considerado é que 8 dos 13 (cerca de 62%) dos microrganismos identificados e produtores de compostos bioativos foram provenientes da mesma coleta realizada no dia 5 de agosto de 2009, essa também foi a coleta com maior número de actinomicetos isolados. A temperatura média da leira nessa coleta foi de 67, 6°C e o pH 8,2. A temperatura alta e o pH mais alcalino podem ter favorecido a presença dos gêneros *Nocardia* e *Streptomyces*. Infelizmente, em meio líquido, nas condições testadas até o momento, não foi observada nenhuma atividade antimicrobiana perceptível, ou seja, nenhum dos nossos extratos teve atividade que permitisse a formação de um halo de inibição quando testado contra as acinetobactérias. Metabólitos isolados de actinomicetos, frequentemente apresentam atividade antimicrobiana em ágar, mas não em cultura líquida (Thakur, *et al* 2007) e está sendo estabelecida a idéia que o meio sólido é mais adequado para o desenvolvimento do isolado e produção de antibiótico (Iwai e Omura, 1982). Muitos podem ter sido os motivos mas, provavelmente, a pequena concentração dos compostos bioativos no extrato seja a principal causa dessa ausência. Nos ensaios de sobrecamada a concentração do antibiótico era indubitavelmente maior, levando-se em consideração a presença do próprio microrganismo. Dos 26 isolados testados por Anibou *et al*, 2008, somente 16 foram capazes de crescer e apresentar atividade antimicrobiana em meio líquido, para todos os isolados selecionados a atividade em meio sólido foi mais significativa que em meio líquido. Outros fatores como a degradação do metabólito secundário pelo próprio actinomiceto, ou fragmentação dos filamentos e micélio podem levar a perda da capacidade de produção de antibiótico pelo microrganismo (Bushell, 1993) e, ainda outra hipótese, seria a modificação química da atividade dos componentes pode levar a inativação dos componentes em caldo de cultura (Gurung, *et al* 2009). Ainda deve-se considerar as condições de cultivo como as fontes de carbono, nitrogênio, pH, temperatura entre outras. Isto é, tanto as condições nutricionais quanto as condições

físicas são relevantes quando se avalia a produção de metabólitos secundários. A busca de uma condição apropriada e otimizada de produção deve ser realizada para avaliação do real potencial destes isolados de actinomicetos.

Agradecimentos:

Agradecemos ao Dr. Afonso Barth por prontamente nos ceder as cepas de acinetobactérias.

A Karina Heck da Silva pela dedicação, ensinamentos e paciência.

A Dra. Sueli Van der Sand pela acolhida e orientação. Muito obrigada a todos.

Referências:

1. OLIVEIRA, M.F.; Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. 2003
2. TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environmental: a review. **Bioresource technology**, Washinton, v.72, p 169-183, 2000.
3. PENESYAN, A. et al. Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potencial as a source of new drugs. **FEMS Microbiol Ecol**, v.69, p113-124, 2009.
4. MIYADOH, S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. **Actinomycetologia**, Amsterdan, v.9, p. 100-106. 1993.
5. RAMESH, S. et al. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. **World J Microbial Biotechnol**, 2009.
6. PATERSON, D.L., The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* species. **Clin Infect Dis**, p 43-48. 2006.
7. LARANJEIRA, V.S. et al. Pesquisa de *Acinetobacter* sp e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo- β -lactamase em hospital de emergência de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43(4):462-464, jul-ago, 2010
8. HOLT, J.G., et al Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. **Baltimore**, v. 4, p 2300-2648. 1989.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI M100-S17, Wayne, Pennsylvania.
10. CHALLIS, G. L. & HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. PNAS, 100: 14555-14561. 2003
11. RODRIGUES, K. Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos isolados de actinomicetos. 2006.
12. THAKUR, D. et al. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. Journal de Mycologie Médicale (2007) 17, 242—249
13. IWAI, Y. and OMURA, S Culture conditions for screening of new antibiotics. Journal Antibiot 35:123–141. 1982
14. ANIBOU, M. et al. Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. World Journal Microbiol Biotechnol 24:2019–2025. 2008
15. BUSHELL, M.E. A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of *streptomyces* isolates in new antibiotics screens. Journal of Fermentation Bioengineering. 76(2): 89-93. 1993
16. GURUNG, T.D. et al. Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar Mount Everest Region. Nepal Journal of Science and Technology 10 (2009) 173-182. 2009