



UNIVERSIDADE CEUMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA-REDE BIONORTE



**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Streptomyces* spp, ISOLADOS DE
CULTURA DE SOJA DO SUL DO ESTADO DO MARANHÃO**

MATHEUS SILVA ALVES

**São Luís, MA
2022**

MATHEUS SILVA ALVES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Streptomyces* spp, ISOLADOS DE
CULTURA DE SOJA DO SUL DO ESTADO DO MARANHÃO**

Tese de doutorado apresentado ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e biotecnologia- Rede BIONORTE, na Universidade CEUMA, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia
Mendonça de Miranda.

São Luís- MA

2022

FICHA CATOLOGRÁFICA

Alves, Matheus Silva.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE *Streptomyces* spp, ISOLADOS DE CULTURA DE SOJA DO SUL DO ESTADO DO MARANHÃO / Matheus Silva Alves. - 2022.

76 p.

Orientador(a): Rita de Cássia Mendonça de Miranda.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Antimicrobiana. 2. Bioativos. 3. Biotecnologia.
4. *Streptomyces*. I. Miranda, Rita de Cássia Mendonça de.
II. Título.

MATHEUS SILVA ALVES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Streptomyces* spp, ISOLADOS DE
CULTURA DE SOJA DO SUL DO ESTADO DO MARANHÃO**

Tese de doutorado apresentado ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e biotecnologia- Rede BIONORTE, na Universidade CEUMA, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Mendonça de Miranda.

Aprova em: / /

Banca examinadora

Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Mendonça de Miranda (Orientadora)
UNICEUMA

Prof.^a. Dr.^a Andrea de Souza Monteiro
UNICEUMA

Prof.^o Dr.^o Afonso Gomes Abreu Junior
UNICEUMA

Prof.^o Dr.^o Wellyson da Cunha Araújo Firmo
UNICEUMA

Prof.^a. Dr.^a Amanda Silva dos Santos Aliança
UNICEUMA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro, gostaria de agradecer a Deus, que sempre me fortaleceu na caminhada e na conquista dos meus **Objetivos**.

Agradecer minha mãe e meu pai, que sempre estiveram me dando apoio, incentivo e suporte para eu poder estudar, desde a minha educação básica até aqui o meu doutorado. Além das minhas irmãs, irmãos e sobrinhos que sempre estão comigo, me divertindo, e tornando os momentos pesados mais leves.

A minha orientadora, prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Miranda Mendonça que me possibilitou um aprendizado gigantesco, além de me proporcionar novas experiências na vida acadêmica me dando autonomia e orientação para construção e desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr^o. Nelson Lima e tudo sua equipe que me receberam na Universidade Minho e muito contribuiu com o desenvolvimento do trabalho e da minha vida acadêmica.

A todos os meus amigos, tanto da vida quanto da academia, que sempre me motivaram e me deram força para continuar, principalmente nos momentos difíceis.

Aos meus alunos, principalmente a Luís Alfredo e Suelen, que sempre estiveram comigo no desenvolvimento do projeto, sempre alegres e dispostos a aprender e contribuir.

A Universidade CEUMA, que me ofereceu estrutura para realizador meus ensaios experimentos, a qual contribui muito na minha vida profissional.

A FAPEMA, que financiou todo o meu projeto. E vale a pena ressaltar que ela tem um grande papel para o desenvolvimento tecnológicos do Maranhão incentivando e financiando os projetos no Estado do Maranhão e garantindo o desenvolvimento também do pesquisador.

RESUMO

ALVES, Matheus Silva. **Atividade antimicrobiana de metabolitos secundários de *Streptomyces* spp, isolados de cultura de soja do sul do estado do Maranhão.** 2022. 76p. Tese (doutorado do pós-graduação da Rede Bionorte) Universidade Ceuma, São Luís, 2022.

O Brasil possui uma extensa área territorial com a presença de diversos biomas. O solo como componentes abiótico dos biomas, pode ser descrito como um agrupamento de reações e processos químicos e biológicos responsáveis pela formação de camadas terrestre e desenvolvimento das plantas, onde pode-se encontrar bactérias filamentosas denominadas Actinomicetos. Esses microrganismos possuem uma vasta capacidade de produção de compostos bioativos, que permite o antagonismo a outros microrganismos na relação de competição por espaço provocando lesão e/ou destruição de outros organismos. Assim, o presente estudo teve por objetivo verificar a ação antimicrobiana de metabolitos secundários produzidos por de *Streptomyces* spp isolados de solo contaminados por agrotóxico no Maranhão. Para isso foram coletados amostra de solo e realizados teste de identificação morfológica e molecular, ensaio enzimáticos e de atividade antimicrobiana como ensaio em meio sólido (bloco de gelose), ensaio em meio líquido (ágar difusão), avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e sinergismo frente aos microrganismos *Klebsiella pneumoniae* ATCC 0023, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0026, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27012, *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 e identificação química preliminar dos extratos. Foram isoladas dez estirpes sendo a maioria *Streptomyces*. Os isolados apenas Act 01, Act 03, Act 06 apresentaram atividades antimicrobiana e esses três isolados foram identificados pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Todas as três linhagens apresentaram capacidade de produzir as enzimas celulase, amilase e protease. Além de apresentarem halo de inibição para patógenos testados com exceção da *K. pneumoniae* ATCC 0023. Em relação a CMI apresentou resultados inibição para *P. aeruginosa* ATCC 0026 (500 µg/mL), *S. aureus* ATCC 6538 (1000 µg/mL), *C. gattii* ATCC 24065 (125 µg/mL). Em relação os compostos isolados do extrato foram determinados a presença de flavonoides, terpenos e alcaloides. Portando, os isolados de *Streptomyces* apresentaram ação antimicrobiana.

Palavras-chave: *Streptomyces*; antimicrobiana; bioativos; biotecnologia.

ABSTRACT

ALVES, Matheus Silva. **Antimicrobial activity of secondary metabolites of *Streptomyces* spp, isolated from soybean in southern Maranhão state.** 2022. 76p. Thesis (doctorate of postgraduate program at Bionorte) Ceuma University, Sao Luis, 2022.

Brazil has an extensive territorial area with the presence of several biomes. Soil as abiotic components of biomes can be described as a grouping of chemical and biological reactions and processes responsible for the formation of land layers and plant development, where filamentous bacteria called Actinomycetes can be found. These microorganisms have a big capacity to produce bioactive compounds, which allows antagonism to other microorganisms in the competition relationship for space, causing injury and/or destruction of other organisms. Based in these aspects, the present work object to verify the antimicrobial action of secondary metabolites produced by Actinomycetes isolated from soil used for soybean planting in Maranhao state. For this, soil samples were collected and performed morphological and molecular identification tests, enzymatic and antimicrobial activity assays such as solid medium assay (agar block), liquid medium assay (diffusion agar), evaluation of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and synergism against the microorganisms *Klebsiella pneumoniae* ATCC 0023, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0026, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27012, *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 and preliminary chemical identification of the extracts. Ten strains were isolated, the most of them being *Streptomyces*. Of the isolates, only the strains Act 01, Act 03, Act 06 showed antimicrobial activities and these three isolates were identified as belonging to the genus *Streptomyces*. All three strains were able to produce cellulase, amylase and protease enzymes. In addition to presenting a halo of inhibition for all tested pathogens with the exception of *Klebsiella pneumoniae*. Regarding the CMI, it presented inhibition results for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0026 (500 µg/mL), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (1000 µg/mL), *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 (125 µg/mL). Regarding the compounds isolated from the extract, the presence of flavonoids, terpenes and alkaloids was determined. Then, the *Streptomyces* isolates demonstrated antimicrobial action and more tests need to be carried out to ensure the biological safety of these bioactives.

Keywords: *Streptomyces*; antimicrobial; bioactives; biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Actinomicetos isolados e purificados de uma amostra contaminados por agrotóxicos.	32
Figura 02: Lâminas de microcultivo dos Actinomicetos (A-Ac10, B-Ac 8 e C-ac3) isolados do solo contaminado com agrotóxico.	34
Figura 03. Árvore filogenéticas construir a partir da sequência do gene 16S rRNA, dos <i>Streptomyces</i> spp isolados de solo contaminado por agrotóxicos	34
Figura 04. Teste de toxidade do extratos acetato de etila utilizando <i>Tenebrio molitor</i> .	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Ensaio enzimática (celulase, amilase, protease e lipase) utilizando Actinomicetos (<i>Streptomyces</i> spp) isolados de solo contaminado por agrotóxicos.	34
Tabela 02: Identificação de compostos químicos identificado no extrato de <i>Streptomyces</i> spp.	35
Tabela 03: Perfil de inibição qualitativo de isolados de Actinomicetos contra patógenos humanos de terminado pelo teste com método bloco em gelose.	36
Tabela 04. Determinação halo de inibição do extrato de acetado de etila de isolados de Actinomicetos contra patógenos humanos.	37
Tabela 05. Determinação de concentração inibitória mínima dos extratos de isolados frente aos patógenos humanos.	37
Tabela 06. Concentração inibitória fracionada do extrato dos metabólitos secundários de Actinomicetes com Fluconazol.	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE BIBLIOGRAFICA	12
2.1. CARACTERIZAÇÃO DO MARANHÃO E DA CIDADE DE BALSAS	12
2.2. BIODIVERSIDADE BRASILEIRA	13
2.3. DIVERSIDADE MICROBIANA - MICROBIOLOGIA DO SOLO	14
2.4. ACTINOMICETES OU ACTINOBACTÉRIAS	15
2.5. METABOLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE BIOLÓGICAS	16
2.5.1. Policetídeo e peptídeos não ribossômicos	16
2.5.2. Atividade biológica dos metabolitos secundários de <i>Streptomyce</i>	18
2.5.2.1 Atividade antibacteriana	18
2.5.2.2 Atividade antifúngica	18
2.5.2.3 Antitumorais	19
2.5.2.4 Atividade antioxidantes	19
2.5.2.5 Enzimas extracelulares	20
3. CAPITULO I: CAPITULO I: ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA JOURNAL APPLIED OF MICROBIOLOGY	21
4. CONCLUSÃO	47
5. REFERENCIA	48
6. ANEXOS	55

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que possui uma extensa área territorial com a presença de diversos biomas (Amazônia, Pantanal, Mata atlântica, Caatinga, Pampas e Cerrado) (VALLI; YOUNG; BOLZANI, 2016). Por possuir dimensões continentais e uma vasta biodiversidade de espécies de animais, plantas e microrganismo o Brasil se torna uma referência para o mundo em questões de biodiversidade ecológica. Essa mesma realidade também pode ser observada no Estado do Maranhão, em relação a diversidade de biomas e biodiversidade. No entanto, ainda são pobres os conhecimentos sobre os potenciais biológicos e sua provável aplicação biotecnológicos dos compostos bioativos oriundos dos organismos desses biomas, principalmente nas descobertas de novos processos e produtos microbianos (PEREIRA, 2019).

O solo como é um componente abióticos dos biomas, pode ser descrito como um agrupamento de reações e processos químicos e biológicos responsáveis pela formação de camadas terrestre e desenvolvimento das plantas (LEPSCH, 2016). Ele apresenta como constituintes a matéria orgânica, minerais, metais, água, uma biodiversidade de organismo, principalmente, o microrganismo. Esse microbioma é formado por fungos, bactérias, algas, protozoários e vírus (PELCZAR, 1997), sendo responsáveis pela decomposição de compostos complexos em pequenas moléculas, mineralização e biorrecuperação do solo contaminado por compostos xenobióticos (MCCARTHY; WILLIAMS, 1992).

No solo pode-se encontrar bactérias filamentosas denominadas Actinomicetos, que são caracterizadas pelo seu crescimento filamentoso, além da produção de micélio de substratos (vegetativo), micélio de esporos (aéreo), o que confere a esta classe de bactérias resistência e sobrevivência em vários habitats (HOLT; KRIEG; SNEATH, 1994).

Esses microrganismos possuem uma vasta taxonomia incluindo espécies com morfologias e capacidades metabólicas variadas (BARKA; VATSA; SANCHEZ; GAVEAU-VAILLANT et al., 2016). Dentre esses microrganismo, o gênero *Streptomyces* destaca-se pela habilidade em produzir compostos bioativos, com produção de enzimas, síntese de substâncias bioativos que permite o antagonismo a outros microrganismos na relação de competição por espaço provocando lesão e/ou destruição de outros organismos (INBAR et al, 2005; CHARLLIS; HOPWOOD, 2003).

Assim, o presente estudo tem por objetivo Avaliar a atividade antimicrobiana dos metabolitos secundários extraídos de *Streptomyces spp* isolados do solo do cerrado,

aumentando assim o arsenal de compostos bioativos disponíveis para diversos fins na indústria farmacêutica, alimentícia, entre outras.

2. REVISÃO DE BIBLIOGRAFICA

2.1. CARACTERIZAÇÃO DO MARANHÃO E DA CIDADE DE BALSAS

O Maranhão é um dos estados pertencentes a federação do Brasil que se está localizado na área de transição entre a região nordeste e a região amazônica. O Estado encontra-se numa posição entre três macrorregiões brasileiras: Nordeste, Norte e Centro Oeste. Dessa forma, reúnem feições fitogeográficas e climatológicas características dessas áreas. Fisiograficamente, o Maranhão apresenta sete microrregiões: Litoral, Baixada Maranhense, Cerrados, Cocais, Amazônia, Chapadões e Planalto. O clima semiúmido abrange grande porção do território maranhense onde os solos apresentam uma grande variedade (SILVA; SANTOS; FEITOSA; SILVA et al., 2016).

O Estado do Maranhão limita-se com três estados brasileiros: Piauí (leste), Tocantins (sul e sudoeste) e Pará (oeste), além do Oceano Atlântico (norte). Com área de 331 937,450 km² e com 217 municípios, é o segundo maior estado da região Nordeste e o oitavo maior estado do Brasil. As principais atividades econômicas são a indústria, os serviços, o extrativismo vegetal (babaçu), a agricultura (soja, mandioca, arroz, milho) e a pecuária (IBGE, 2017).

Balsas é um dos 217 municípios do Maranhão que tenha ganhando destaque, nas últimas décadas, pela produção de grãos, principalmente a soja. Ele ocupa uma área de 13.141.162 Km², está situada no cerrado localizado na região do Sul do Maranhão, com uma população estimada em 96.951 habitantes. Em relação sua economia é em grande parte gerada em torno da agropecuária, e a soja é o seu principal produto comercializado (IBGE, 2020).

Estudos tem demonstrados que no cerrado o cultivo de soja é responsável pelo maior consumo de agrotóxicos dentre os outros tipos de cultivo. (COSTA, 2021) Como Balsas está situado no cerrado não estar fora desse cenário, utilizando uma alta quantidade de agroquímicos que ajudam na produção entretanto causam problemas diversos como: contaminação de águas, contaminação da poluição que induz a mutações genéticas provocando um grande quantidade de doenças.

2.2. BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

A pesar do conhecimento da existência de uma grande variedade de formas de vida ser muita antiga (MAYR; PROVINE, 1998), a definição do termo biodiversidade começa a ser construída a partir de 1985 por Walter G. Rose durante o planejamento de um fórum de diversidade biológica realizado no ano seguinte 1986 (MEINE; SOULÉ; NOSS, 2006; SARKAR, 2002; WILSON, 1997). Mas apenas em 1988 que a biodiversidade aparece com o conceito de forma contraída de diversidade biológica no livro organizado por Edward O. Wilson que deve como referência os resultados do *National Forum on* (SARKAR, 2002; WILSON, 1997).

Em 1992, um decreto legislativo referente a uma Convenção sobre diversidade biológica conceitua a biodiversidade ou diversidade biológica como sendo a diversidade de seres vivos que compreende a variabilidade de organismos vivos de todas as origens (incluindo ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos) e os processos ecológicos envolvidos nesse ecossistema, além da diversidade dentro de espécies, entre espécies e entre ecossistemas, abrangendo os níveis de diversidade de ecossistemas, diversidade de espécies e diversidade genética (FRANCO, 2013).

Nesse contexto, sabemos que o Brasil apresenta uma biodiversidade grande sendo formado por vários biomas. Essa quantidade de biomas pode justificar a biodiversidade do gigantesca do Brasil. Dentre os biomas podemos evidenciar o Cerrado que é caracterizado por florestas estacionais e campos. Esse bioma está presente nos estados do Brasil Central (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal), além de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Tocantins, Bahia, Piauí e Maranhão (AGUIAR; SANTOS; ARÊDES; SILVA, 2016).

2.3. DIVERSIDADE MICROBIANA - MICROBIOLOGIA DO SOLO

A formação do solo é um processo dinâmico e continua resultado das interações complexas entre o material parental (rochas, areia, aluviões glaciais, e assim por diante), a topografia, o clima e os organismos vivos, que garantem uma série de combinações de processos químicos, físicos e biológicos. Assim, de forma geral, o solo é constituído, por pelo menos, cinco elementos básicos: minerais (40%), matéria orgânica, macro e microrganismos vivos, ar e água (50%) (MADIGAN; MARTINKO; BENDER; BUCKLEY et al., 2016).

Essa constituição torna o solo um habitat complexo que apresenta na visão microbiológica, numerosos microambientes e nichos que contribuem para a fixação de uma biodiversidade de organismo, principalmente de microrganismos. Esses microrganismos apresentaram sua atividade biológicas condicionadas por fatores ambientais que muitas das vezes podem ser limitantes como a presença de oxigênios e determinados nutrientes, como nitrogênio e fosfato. Mais também depende das relações ecológicas que fazem com os demais organismos (DUBEY; TRIPATHI; UPADHYAY, 2006).

Esses microrganismos são importantes para o solo e para manutenção da vida presente nele, pois são responsáveis pela degradação de matéria orgânica, realizando sequestros de elementos e produzindo uma variedade de biomoléculas e metabólitos secundários que são liberados para degradação microbiana, realizada por enzimas específicas, transformando uma molécula em outra, levando à liberação de elementos em forma inorgânica (IBEKWE; PAPIERNIK; YANG, 2004; ZHANG; KALLIMANIS; KOUKKOU; DRAINAS, 2004). Esses microrganismos, provam ter enzimas específicas que realizam biotransformações (HOSTER; SCHMITZ; DANIEL, 2005; LUCKARIFT; DALTON; SHARMA; BOYD et al., 2004), que têm relevância não apenas para a biorremediação, mas também para a biotecnologia industrial (LEE; WON; LIM; KIM et al., 2004; YUN; KANG; PARK; YOON et al., 2004).

Dos microrganismos residentes no solo, é possível observar, que por exemplo, os fungos ocorrem mais facilmente em ambientes ácidos; algumas bactérias fixadoras do nitrogênio só são encontradas em solos com pH acima de 6,0. Já as actinobactérias, são mais predominantes em solos orgânicos com pH neutro a ligeiramente alcalinos (MADIGAN, 2010).

2.4. ACTINOMICETES OU ACTINOBACTÉRIAS

Actinobactérias são bactérias filamentosas pertencentes ao filo Actinobactérias e ordem Actinomycetales. A palavra Actinomycetes deriva de duas palavras gregas: “aktis” que significa relâmpago ou raio e “mykes” que significa fungos. Eles por muito tempo foram caracterizados como fungos, mas depois com estudos detalhados percebeu que eram bactérias GRAM-positivas filamentosas, podendo ser aeróbico, anaeróbico ou anaeróbico facultativo, produtoras de micélios aéreos, parede celular ácido murâmico, ácido diaminopimélico ou lisina. Outros estudos moleculares mostraram uma grandes quantidades de nucleotídeos dos tipos C e G (57-75%) que também começou a fazer parte de sua caracterização molecular (KONEMAN; WINN JR; ALLEN; JANDA et al., 2012; SEGARAN; SUNDAR; SETTU; SHANKAR et al., 2017).

Esses microrganismo produzem um composto volátil chamado de geosminas que está ligado a seu odor característico de terra úmida das actinobactérias (AGRAWAL, 2002; ARAUJO-MELO; SOUZA; VICALVI-COSTA; DE ARAÚJO et al., 2016),

As actinobactérias são onipresente e formam uma população estável e persistente em vários ecossistemas, especialmente em solos alcalinos secos ((VEIGA; ESPARIS; FABREGAS, 1983). Esses microrganismos são conhecidos por produzirem uma extensa variedade e diversidades compostos biológicos conhecidos como bioativos, que podem tem a capacidade de inibir o desenvolvimento de patógenos presentes no solo na disputa da vida por competição (SHARMA; ANEJA; MAYER; MUNCH et al., 2005).

As actinobactérias mais importantes na microbiologia do solo, pertecem aos gêneros os *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora* e *Thermoactinomyces*. Essas bactérias podem ser facilmente encontradas no solo, sendo produtora de substâncias que atuam na degradação de moléculas complexas, como as substâncias recalcitrantes principalmente lignocelulose, celulose, hemiceluloses e lignina, e assim desempenham um papel importante no processo de decomposição da matéria orgânica do solo para que os nutrientes fiquem disponíveis para outros seres vivos (DING; JIANG; LI; LI et al., 2004; PETROSYAN; GARCÍA-VARELA; LUZ-MADRIGAL; HUITRON et al., 2003).

Actinobactérias são descritas na literatura por possuírem a capacidade de produzir ampla quantidade de metabólitos secundários, dentre eles enzimas, inibidores enzimáticos, e principalmente antibióticos, que frequentemente são utilizados na Agricultura, Medicina e Veterinária (INBAR; GREEN; HADAR; MINZ, 2005).

De acordo com o banco de dados National Center for Biotechnology Information (Database resources of the National Center for Biotechnology Information, 2018), o gênero *Streptomyces* pertence à família Streptomycetaceae; subordem Streptomycineae; ordem Actinomycetales e subclasse Actinobacteridae. Este gênero é um dos maiores gêneros, pois contém mais de 500 espécies (MOHANRAJ; SEKAR, 2013).

As bactérias do gênero *Streptomyces* são conhecidos pelos seus efeitos de síntese de biossintéticos que tem como produtos final compostos naturais complexos. Com o advento da genômica houve uma mudança da perspectiva de investigação dos compostos produzidos por esses microrganismos. Eles apresentam um único cromossomo linear e plasmídeos que podem ser circulares ou lineares. Outra característica que podem ser observados em seu genoma é a capacidade de formar aglomerados de genes biossintéticos que sintetizam enzimas que formam metabolitos secundários, como uma variedade de compostos químicos que incluem policetídeo, lactamas, peptídeos não ribossômicos, terpeno e outros produtos naturais. Esses metabolitos secundários são sintetizados na fase de mudança do micélio para a esporulação (HWANG; KIM; CHARUSANTI; PALSSON et al., 2014). A produção desses metabolitos secundários são de grande relevância médica e industrial (BRAÑA; FIEDLER; NAVA; GONZÁLEZ et al., 2015).

2.5. METABOLITOS SECUNDÁRIOS

2.5.1. Policetídeo e peptídeos não ribossômicos

Dentre os metabólitos secundários produzidos pelos *Streptomyces*, há duas grandes classes que são policetídeo e peptídeos não-ribossômicos. Esses metabolitos apresentam uma variedade de funções estruturais e fisiológicas com ação terapêutica (HWANG; KIM; CHARUSANTI; PALSSON et al., 2014).

A biossíntese de policetídeo é semelhante aos mecanismos com a biossíntese de ácidos graxos, onde em cada etapa há alongamento repetitivo que envolve uma condensação de Claisen que incorpora a unidade extensora na cadeia crescente. Diferentemente do que acontece na síntese ácidos graxos, na biossíntese de policetídeo podem utilizar unidades acil-CoA mais diversas, por exemplo malonil-CoA, metilmalonil-CoA e etilmalonil-CoA, e o β -carbono na unidade extensora recém-incorporada pode ter diferentes estados de oxidação. Além disso, a modificação estrutural de metabólitos secundários, incluindo glicosilação, aminação e metilação, que ocorre após a o

esqueleto policetídeo ser sintetizado, é outra característica bioquímica exclusiva da biossíntese de metabólitos secundários (HWANG; KIM; CHARUSANTI; PALSSON et al., 2014).

As policetidas sintases (PKS's), que são um complexo de enzimas que produzem uma gama de estruturalmente diversificada de metabólitos secundários e também grande atividade biológica (WALSH, 2004). São agrupados, segundo as suas funções e estruturas, em três grupos: os tipos I e II presente apenas em microrganismos e o III que além de estarem presentes em microrganismos podem também estão presentes em plantas (SHIMIZU; OGATA; GOTO, 2017).

Os PKS do tipo I são formados por proteínas multifuncionais e multimodulares que produzem principalmente macrólídeos, um composto com ação antibacteriana. Eles consistem em vários módulos, cada um dos quais composto por domínios com funções específicas. Cada módulo sempre carrega três domínios principais: aciltransferase (AT), proteína transportadora de acila (ACP) e cetossintase. Esses domínios são responsáveis pelo alongamento do esqueleto policetídeo, inserido grande gama de unidades extensoras (por exemplo, malonil-CoA). Alguns módulos também contêm domínios acessórios, que podem ser do tipo β -cetoreductase, desidratase e enoilreductase, que catalisam a redução do β -carbono na unidade extensora de uma maneira dependente de NADPH. Esses domínios acessórios estão presentes em alguns módulos, mas não em outros. Quando os policetídeos atingem o módulo final do PKS, o alongamento do policetídeo é terminado por hidrólise no domínio da tioesterase ((HWANG; KIM; CHARUSANTI; PALSSON et al., 2014).

Ao contrário do acontece com as PKS do tipo I, as PKS do tipo II são complexo de proteínas monofuncionais individuais, produzindo policetídeos aromáticos (por exemplo, tetraciclinas e actinorodina). Os PKSs do tipo II alongam os policetídeos por meio de reações de condensação repetitiva catalisadas pela heterodímero-cetosintase e ACP, e parecem ter mais especificidade de substrato, quase sempre utilizando acetil-CoA e malonil-CoA como unidades iniciador e extensor, respectivamente. Após o procedimento de condensação, os policetídeos aromáticos podem ser reduzidos pela cetoreductase e modificados após a tradução pela aromatase, ciclase e glicosilase (HWANG; KIM; CHARUSANTI; PALSSON et al., 2014).

Enquanto isso, em contraste aos sistemas PKS do tipo I e II, o tipo III PKSs, são homodímero da enzima cetoreductase, não usa ACP para o alongamento da cadeia de carbono e atua diretamente nas unidades extensoras na forma de acil-CoA para catalisar condensações iterativas das unidades extensoras (JESUS, 2016).

Já os peptídeos não ribossômicos (NRPS) são constituídos de enormes proteínas multimodulares, nas quais a condensação (C), adenilação (A) e tiolação (T) que domínios anexados uns aos outros iguais em uma corda. A ação combinada desses domínios permite o alongamento da cadeia peptídica nascente em um aminoácido por módulo. Em um módulo de alongamento mínimo, um domínio A ativa o aminoácido, um domínio T carrega intermediários como tioésteres no braço da fosfopantetina e um domínio C forma a ligação peptídica. Uma variedade de domínios acessórios oferece opções opcionais funcionalidades como epimerização, ciclização ou N-metilação. Finalmente, uma tioesterase cliva o peptídeo da enzima em uma forma linear ou cíclica. Inúmeros medicamentos usados na clínica, como o imunossupressor, a ciclosporina e os antibióticos vancomicina, daptomicina e penicilina são biossintetizados por NRPS. (KRIES, 2016).

2.5.2 Atividade biológica dos metabolitos secundários de *Streptomyces*

2.5.2.1 Atividade antibacteriana

Substância com atividade antibacteriana tanto podem inibir o crescimento bacterianos quanto podem matar bactérias. As doenças infecciosas continuam sendo uma das principais causas de morte devido a microrganismos resistentes a antibióticos. Essa resistência provoca uma diminuição da eficácia dos antibióticos e por isso tem-se investido no desenvolvimento de novas alternativas para superar essa problemática.

Como o gênero *Streptomyces* apresenta como uma característica marcante que é a capacidade de produzir antibióticos, então eles são grandes promissores para a investigação de novos fármacos com ação antimicrobiana (LIMA, 2017). As principais classes de antibióticos produzidos por *Streptomyces* incluem aminoglicosídeos, antraciclinas, glicopeptídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, polienos, poliésteres e tetraciclinas (ANTUNES; SALAMONI; FRAZZON; GERMANI et al., 2013). E mais recentemente foram descobertos abissomicina C, bonactina, di-hidroquinonas cloradas, diazepinomicina, Frigociclinona, dinamicinas entre outros (BRAÑA; FIEDLER; NAVA; GONZÁLEZ et al., 2015).

2.5.2.2 Atividade antifúngica

Em geral, as espécies de bactérias do gênero *Streptomyces* são saprofíticas e comumente associadas a solos, onde contribuem significativamente para a rotatividade de biopolímeros e antibióticos complexos (WANNER; HAYNES, 2009). Esses

microrganismos são potentes produtores de antifúngicos, capaz de realizar a biossíntese de quitinase uma enzima que tem a capacidade de degradar a quitina, componente da parede celular dos fungos. Além da quitinase, também já foram descritos outros bioativos com atividade antifúngica produzidas por *Streptomyces* são eles: Chandrananimicina A (MASKEY; LI; QIN; FIEBIG et al., 2003) 2003b) e N- (2-hidroxifenil) -2-fenazinamina (NHP) (GAO; LU; XING; MA et al., 2012).

2.5.2.3 Antitumorais

Substâncias produzidas por *Streptomyces* utilizadas no tratamento do câncer começaram a surgir por volta de 1940 com a descoberta de actinomicina D. Desde então, muitas outras substâncias com propriedades anticâncer têm sido isoladas desse gênero (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). Hoje, são muitas as classes de compostos anticancerígenos produzidos por *Streptomyces*, algumas delas clinicamente úteis, tais como antraciclinas, peptídeos, glicosídeos, enediinas, indóis, policetídeos, antimetabólicos, carzinofilina e mitomicinas (NEWMAN; CRAGG, 2007; OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2009).

Mesmo com a abundante variedade de compostos isolados, a pesquisa por novas substâncias anticâncer ainda é imprescindível devido ao contínuo desenvolvimento de resistência aos medicamentos quimioterápicos, assim como a elevada toxicidade e os efeitos colaterais relacionados. Portanto, é necessária a investigação de novas substâncias com menos efeitos secundários e/ou com maior eficiência terapêutica (OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2009).

2.5.2.4 Atividade antioxidantes

Os antioxidantes funcionam para exercer efeito protetor na saúde humana contra danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO). Os EROS, como os radicais hidroxila, superóxido e peroxila, atacam macromoléculas, incluindo lipídios de membrana, proteínas e DNA, que subsequentemente levam a sérias complicações de saúde como câncer, *diabetes mellitus* e doenças inflamatórias crônicas e neurodegenerativas (RAHAL; KUMAR; SINGH; YADAV et al., 2014).

Estudos de TAN (2018) com o extrato MUM292 oriundo do isolado *Streptomyces* sp. de solo, exibiu a atividades de eliminação de radicais livres. Os potenciais antioxidantes do extrato de MUM292 podem ser atribuídos à presença de compostos bioativos, incluindo dipeptídeos cíclicos e compostos fenólicos. Em conjunto, o presente

estudo demonstrou que o *Streptomyces* tem um grande potencial para produzir metabólito antioxidante. Além disso, do ponto de vista econômico, o cultivo da cepa MUM292 poderia atender à crescente demanda da indústria de processamento de alimentos pelo fornecimento contínuo de antioxidante natural. De fato, a produção microbiana poderia servir como uma fonte sustentável de antioxidantes naturais e, portanto, é mais econômica em comparação à síntese química de antioxidantes sintéticos (TAN; CHAN; CHAN; KHAN et al., 2018).

2.5.5.2 Enzimas extracelulares

Esses metabólitos têm atividades biológicas potenciais consideradas útil para várias aplicações em medicina, ciências veterinárias, e agricultura (BERDY, 2005; RAJA; PRABAKARANA, 2011). Além da produção desses metabólitos secundários, *Streptomyces* é conhecido por secretar uma ampla gama de enzimas extracelulares, e os tipos dessas enzimas são importantes em várias indústrias processos: celulase, xilanase, quitinase, amilase, pectinase, protease e lipase ((KASHIWAGI; OGINO; KONDO, 2017).

Essas enzimas extracelulares, são substâncias que tem por função catalisar diversas reações biológicas, acelerar ou possibilitar que tais reações aconteçam. São responsáveis pela viabilidade em diversos processos metabólicos e são produzidas por todos os organismos vivos. O que torna essas bactérias especiais quando relacionado à expressão de enzimas, são justamente quais enzimas podem estar sendo expressas e como elas podem ser utilizadas nos ramos da Biotecnologia, que é a área responsável pela utilização de produtos produzidos por organismos vivos que possuam interesse econômico (ANTUNES; SALAMONI; FRAZZON; GERMANI et al., 2013).

A área farmacêutica, agroindústria, indústria alimentícia e petroquímica são as mais relacionadas com a utilização de actinomicetos (visando as enzimas expressas por essas bactérias) em diversas situações, seja na produção de alimentos, fármacos, pesticidas, ou mesmo nas formulações visando a biorremediação, que, de acordo com Duarte (2012) se trata da revitalização de áreas contaminadas com misturas derivadas do diesel e biodiesel (DUARTE, 2012). Em todas essas formulações essas enzimas estariam as suplementando para garantir e viabilizar reações químicas necessárias dentro do produto ou área desejada. Como as lipases, capazes de catalisarem reações que hidrolisam ésteres constituintes do biodiesel (SOUZA, 2018).

**3. CAPITULO I: ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA JOURNAL APLLIED
OF MICROBIOLOGY**

Atividade antimicrobiana de metabolitos secundário de *Streptomyces* spp isolados de solo contaminado com agrotóxicos no sul do Maranhão

Alves, Matheus Silva^a; Nelson Lima^c; Sales, Luiz Alfredo Torres ^e; Amaral, Suelem dos Santos^d; Mendonça, Rita de Cássia Miranda ^b.

^a Professor, departamento de Farmácia da Universidade CEUMA

^b Professor Pós-graduação, Universidade CEUMA

^c Professor da Universidade Minho

^d Graduado do curso de farmácia da Universidade Ceuma.

^e Graduado do curso de biomedicina da Universidade Ceuma.

Resumo

Objetivo: Avaliar a ação antimicrobiana de metabolitos secundários produzidos por *Streptomyces* spp. isolados de solo contaminado com agrotóxico no Maranhão.

Métodos e resultados: Foram coletadas, em dez pontos equidistantes, amostra de solo contaminados com agrotóxico em seguida foi feito um *pool* para obtenção da amostra composta. Os microrganismos isolados pela técnica de diluição seriada foram identificados pela morfologia e por técnicas moleculares (região 16SrRNA). O potencial biotecnológico dos isolados foram avaliado através dos ensaios de atividades enzimáticos (amilase, celulase, protease e lipase), ensaio em meio líquido para a atividade antimicrobiana (difusão em ágar, CIM e sinergismo) frente aos patógenos *Klebsiella pneumoniae* ATCC 0023, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0026, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27012, *Cryptococcus gattii* ATCC 24065, identificação química dos extratos e ensaio de verificar a efeito protetor dos extratos *Tenebrio molitor*. Foram isoladas linhagens03 bactérias do gênero *Streptomyces*. Os isolados, chamados de linhagens Ac 01, Ac 03 e Ac 06, apresentaram ação antimicrobiana em teste de ágar difusão. Os extratos isolados desses microrganismos foram identificados por absorbância apresentando como composição: flavonoides, terpenos e alcaloides. Esses extratos apresentam atividade de celulase, amilase e protease. Para esses

extratos foi observado a formação de CIM para *P. aeruginosa* (500 µg/mL), *S. aureus* (1000 µg/mL), *C. gattii* (125 µg/mL).

Conclusão: Os *Streptomyces* apresentaram ação antimicrobiana contra *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Não apresentou proteção contra infecção no ensaio com o *Tenebrio molitor*.

Palavras chaves: *Streptomyces*; antimicrobiana; bioativos; biotecnologia.

INTRODUÇÃO

Os actinomicetos são bactérias caracterizando-as como Gram-positivas, apresentando em seu genoma altas quantidades de guanina e citosina, crescimento filamentoso, presença de esporos e sobrevivem em diversos habitats. (BATISTA, 2010; SATHEEJA, 2011; PASSARI et al., 2015; KUMAR, 2016).

Essas bactérias representam cerca de 30% da microbiota presente no solo, onde participam, naturalmente, do reciclagem orgânica transformando compostos complexos em pequenas moléculas e também são utilizados na biorrecuperação de solos contaminados por agrotóxicos (KENNEDY, 1999; SILVA et al., 2013; BARKA et al., 2016).

Além das ações já citado, anteriormente, esses microrganismos são conhecidos por produzirem substancias de alto potencial biotecnológico, tais como: enzimas extracelulares, vitaminas agentes antioxidantes, cardiovasculares e principalmente antimicrobianos (TIAN et. al., 2004; SOCIETIES, 2017; SANTOS, 2021).

Recentemente, entre do grupo de Actinomicetos os pertencentes a ordem Actinomicetales é a principal fonte de antimicrobiano, contribuindo com cerca de

3000 moléculas, mais de 90% produzida por representantes do gênero *Streptomyces*. (SANTOS, 2021).

A descoberta de antimicrobianos, como a penicilina, revolucionou o cenário de morte que acometia as pessoas por infecção bacterianas. A eficácia da penicilina disseminou seu uso. Por isso a mais passou a ser utilizada em para sintomas de dores e febre. Essa utilização durante antes favoreceu o aparecimento de cepas resistentes a penicilina (GUIMARÃES, 2017).

Durantes os anos seguintes novos antimicrobianos foram descobertos e produzidos e devidos ao uso irracional promoveu o aparecimento de cepas resistentes a esses novos compostos. Com isso, a disponibilidade de antimicrobiano ficou reduzida necessitando, assim, da buscas por novos antimicrobianos (LIMA, 2017).

Grande parte dos microrganismo, que causas infecções, já apresentam resistência ao arsenal de antimicrobianos disponíveis. Como os actinomicetes, especialmente os *Streptomyces*, possui um amplo potencial de produção de antimicrobianos naturais. Nesse contexto, este estudo tem como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de actinomicetes (*Streptomyces*) isolados de solo contaminados por agrotóxico o frente as microrganismo patogênicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da Área e Coleta do Solo

As amostras foram coletadas em solo com histórico de utilização de agroquímico, localizada no município de Balsas-MA, Brasil (S' 07° 10' 13.1" WO 45° 43' 26.0"), no ano de 2019.

Microrganismos utilizados

Os microrganismos *Klebsiella pneumoniae* ATCC 0023, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0026, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27012, *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 foram utilizados nos ensaios de atividade biológica. Todos foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Ceuma.

Isolamento dos Actinomicetos

Para isolar os Actinomicetos, a amostra foi suspendida em 90 mL de soro fisiológico 0,9%. Após 1 hora de agitação, a amostra foi submetida a diluições seriadas decimais até o fator 10^{-4} . Em seguida, alíquotas de 100 μ L das diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram inoculadas em triplicata na superfície de placas de Petri por meio da técnica de espalhamento com auxílio da alça de Drigalski. Os meios de cultura utilizados foram: Ágar-Sabouraud-Dextrose (ASD), Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Ágar-Czapek (ACZ) todos da marca Kasvi. As placas foram incubadas a 28°C em estufa com Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) por 5 dias. Após crescimento dos microrganismos as bactérias Actinomicetos foram isoladas e cultivadas em meio cultura BDA.

Identificação morfológica dos actinomicetes

Os actinomicetos isolados foram caracterizados morfolologicamente avaliando: sua superfície, forma, tamanho das colônias e a produção de pigmentos. Já para a identificação micro morfológica, foi realizado microculturas para observações da fragmentação micelial, agrupamento e arranjo de esporos, de acordo com protocolo International *Streptomyces* Project (SHIRLING; GOTTLIEB, 1970).

Identificação molecular utilizando a sequenciamento do gene 16S rRNA.

Extração de DNA total

A extração foi otimizada a partir do cultivo dos Actinomicetos isolados. O meio contendo os Actinomicetos foi centrifugada a 9 000 rpm por 10 min para obtenção da biomassa, a mesma foi lavada com em Phosphate Buffered Saline (PBS) esterilizado e depois centrifugado (9 000 rpm por 10 min), esse procedimento foi realizado por 3 vezes para retirada total de impurezas. Em 200 mg da biomassa foi adicionado 1mL de CTAB (Cetrimonium bromide) a 2% e em microtubos contendo pérolas de vidro. Em seguida foi levado ao termobloco a 65°C durante meia hora. Novamente foi centrifugado 14 000 rpm durante 8 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 2mL. Esse sobrenadante foi misturado de acetado de sódio (3M) gelado, e incubado a -20 °C por 10 min, foi centrifugado a 14000 rpm por 10 min. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de álcool isopropílico puro. Novamente foi centrifugado a 14.000 rpm durante 10 min e foi descartado o sobrenadante e adicionado etanol (70%) refrigerado a -20° C, foi centrifugado a 6 000 RPM por 7 min e descartado o sobrenadante e o “pellet” foi suspenso em água ultrapura. A concentração e a pureza foram avaliadas utilizando um espectrofotômetro (Nanodrop Lifetechnologies). E a integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

Reação de amplificação em cadeia

Para amplificação foi utilizando oligonucleotídeos universais 27F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') e 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT-3') para a identificação do gene 16S rRNA (HEUER; SMALA, 1997). A reação era constituída 12,5 uL de GoTaq® Green (Master Mix, 2X), 1 uL do primer 27F (100mM) e 1uL do primer 1492R (100mM), 1 uL do DNA (30 ng/μL) 9,5 μL de

128 água Milli-Q resultando no volume final de 25 µL para cada reação. As condições
129 do termociclador foram: desnaturação inicial 94° C por quatro minutos; 35 ciclos
130 configurado com a temperatura de desnaturação de 94° C por um minuto,
131 temperatura de anelamento de 55° C por um minuto e temperatura de extensão
132 a 72° C por dois minutos, e uma temperatura final de extensão de 72° C por 10
133 minutos (KIM et al., 1996). A amplificação do DNA foi avaliada por meio de
134 eletroforese em gel de agarose a 1,0%, utilizando 5 µL das amostras de DNA
135 amplificado. Em seguida foi encaminhada para empresa Myleus para a
136 purificação e sequenciamento das amostras.

137 **Construção da árvore filogenética.**

138 A árvore filogenética foi construída a partir do Gene 16S rRNA. As sequencias
139 dos isolados foram alinhadas com isolados de Actinomicetos de solo
140 maranhense e sequencias depositados do genbank. Para alinhar e construir a
141 árvore filogenética foi utilizado o Software Mega X (KUMAR; STECHER; LI;
142 KNYAZ et al., 2018).

143 **Identificação química dos metabolitos secundários**

144 Para a análise química dos extratos foi utilizado a espectro de absorção em
145 equipamento Espectrofotômetro UV marca Shimadzu modelo Quati E4230 uma
146 em leitura de varredura (200 a 700nm). Os picos de maior intensidade foram
147 registrados e comparados com o comprimento de onda dos compostos relatados
148 na literatura.

149 **Ensaio de Atividade Biológica**

150 **Ensaio Enzimático**

A avaliação da produção de enzimas foi realizada do modo qualitativo, através do semeio em placas de Petri contendo os meios com substrato específico para cada enzima procurada, seguindo a metodologia descrita por Dingle et al (1953) e Sierra (1957) com modificações. As enzimas avaliadas foram: amilase, protease, celulase e lipase. Todos os testes foram realizados em triplicata

Atividade Antimicrobiana

Ensaio em Meio sólido

Para o ensaio em meio sólido, utilizou-se 1 mL da suspensão do microorganismo patógeno, diluídos 0,5 na escala de MacFarland, e semeados em placas contendo meio de cultura Agar Müller-Hinton. Após este, retirou-se as colônias de actinomicetos cortadas de forma esférica, em blocos (discos com micélio de aproximadamente 5 mm de diâmetro), e adicionadas em triplicata à placa com o patógeno semeado. Em seguida, as amostras foram armazenadas em estufa BOD a 28°C por um período de 36 horas, posteriormente feita a análise da atividade através da medição do diâmetro do halo de inibição formado. Todos os testes foram realizados em triplicata para retirada de média e desvio padrão.

Ensaio em Meio Líquido

Cultivo para obtenção dos extratos

Para a produção de metabolitos foram inoculados em frascos Erlenmeyer contendo 125 mL de meio de cultura Batata Dextrose (BD) 3 blocos (5 mm) de meio sólidos contendo os actinomicetos ativos no ensaio anterior previamente crescidos). Os caldos foram cultivados durante 15 a 20 dias sob agitação de 150rpm a uma temperatura de 28° C.

Em seguida a biomassa e os metabolitos foram separados por centrifugação a 6000 rpm durante 10 min. A biomassa foi descartada e o líquido contendo os metabolitos foi submetido a um processo de extração líquido-líquido utilizando o solvente orgânico acetato de etila na proporção de 1:1(v/v). O extrato de etila foi concentrado por rota-evaporação promovendo a eliminação do solvente volátil. Os extratos obtidos foram pesados para quantificar o seu rendimento, identificados e armazenados a 10°C.

Ensaio de Difusão em Ágar

Para a avaliação da ação antimicrobiana dos metabólitos extraídos foi realizado o ensaio de difusão em ágar de acordo com técnica preconizada por Kirby-Bauer, (1966) (HUDZICKI, 2009) que consiste em semear o volume de 100 µL de um inóculo de cada patógeno na concentração de $1,5 \times 10^8$ unidade formadora de colônia em placa de Petri contendo o meio BDA que foram perfuradas para a formação de três poços de 5 mm, para a adição do extrato contendo os metabolito secundário. O extrato foi suspenso em Dimetil Sulfoxido (DMSO) e diluído para se obter uma concentração de 1 mg/mL. As placas foram incubadas a 28°C durante 24h e 48h.

Para os extratos que apresentaram atividade, foi determinado o diâmetro do halo formados, para serem comparados e interpretados segundo os critérios preconizados pelo "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI)

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Depois de realizado o ensaio de difusão em ágar cinco microrganismos (*P. aeruginosa* ATCC 0026, *K. pneumoniae* ATCC 0023, *S. aureus* ATCC 6538, *C. gattii* ATCC 24065) foram selecionados para a determinação da concentração

inibitória mínima (CIM) utilizando o extrato da fração acetado de etila dos isolados que apresentaram ação biológica no ensaio em meio líquido. Para isso, foram preparados inóculos em solução salina esterilizados microrganismo e testes padronizados de acordo com a escala de Mc Farland (1×10^8 UFC/mL). A atividade inibitória foi verificada pelas técnicas de microdiluição. Inicialmente foram distribuídos 100 µL de caldo Muller Hinton para as bactérias e RPMI para os fungos, em cada poço da placa. Em seguida, foram dispensados 100 µL de cada extrato padronizados na concentração inicial de 1000 µg/mL nas cavidades da primeira linha. Seguindo o processo de diluição seriada, foram retirados 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, e assim sucessivamente. Nos orifícios de cada coluna foram dispensados 10 µL do inoculo correspondente a cada cepa ensaiada. A linha onze foi reservada para o controle negativo com o caldo e a linha doze para o controle positivo fluconazol para fungo e ampicilina para bactérias. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada extrato, incubados a temperatura 37° C por até 48h. As leituras de determinação da CIM dos extratos, foram realizadas através do método visual.

Para confirmar da inibição foi adicionado nos poços a 30 µL de resazurina (0,1%), depois a placa foi novamente incubada 37°C por 24 horas. Os poços que apresentaram a mudança de cor azul para rosa sinalizam crescimento e metabolização microbiana, já os poços que continuavam com a cor azul sinaliza que não há crescimento de microrganismo indica a inibição.

Teste de Sinergismo

Após a determinação da CIM para o extrato foi realizado o ensaio de sinergismo do extrato com Fluconazol, e também entre o extrato e anfotericina B, ambos os fármacos antifúngicos. Nessa técnica, cada poço contém uma combinação única

de diferentes concentrações dos metabolitos do *Streptomyces* sp e o fluconazol ou anfotericina B, no qual se determinou o percentual de inibição do crescimento do *C. gatii* ATCC 24065 na presença de diferentes combinações (extratos e fármacos) em relação ao poço controle. A concentração inicial das drogas em combinação foi a própria CIM obtida para cada isolado individual. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas do combinado (fármaco e extrato), a fim de se atingir uma concentração final que fosse 256 vezes menor que a concentração final do fármaco isolado. A interação entre os fármacos foi realizada a partir da determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI) o qual é obtido pela soma do FIC (Concentração inibitória fracionária) de cada 2 extratos, que se trata da relação entre o CIM de cada extrato utilizado em combinação e o CIM do mesmo fármaco utilizado sozinho. Dessa forma, foram considerados os seguintes parâmetros: $FICI \leq 0,5$: sinergismo, $> 4,0$: antagonismo e $0,5 < FICI < 4,0$: indiferente (OLIVEIRA; FERRARINI; DOS SANTOS; VARELA et al., 2020).

Ensaio de atividade biológica com *Tenebrio molitor*

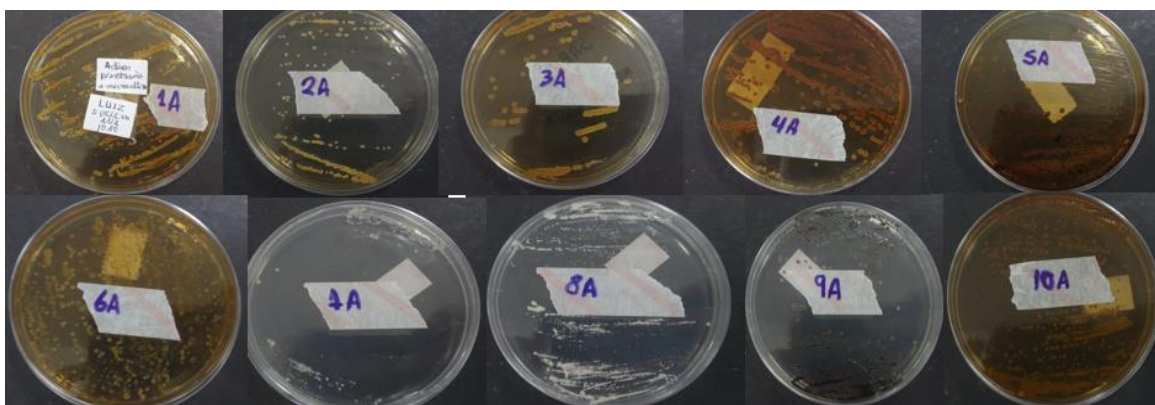
Após a determinação da CIM foi realizado um ensaio de infecção utilizando larvas de *Tenebrio molitor*. As larvas foram mantidas em recipientes com a dieta até o último estágio larvar (estágio 5). Foram testadas com os extratos Act 01 e act 03 (125 µg/mL). Foram utilizados grupo controle positivo com *C. gatii* (10^8 unidade formadora de colônia) e controle negativo PBS, um grupo com extrato do act 01(125 µg/mL) e outro act 03 (125 µg/mL). Cada grupo era formado por 10 indivíduos. Depois de injetado as solução as lavar foram observadas durante 10 dias e quantificado o número de animais que morreram.

RESULTADOS

Isolamento

Os isolados do solo apresentaram diversidade de microrganismo e se conseguiu isolar dez bactérias. As 10 bactérias eram ordem actinomicetales e foram selecionadas de acordo com as características macromorfológicas, cor, textura e dureza das colônias, formação de micélio aéreo, disposição no meio de cultura e liberação ou não de pigmentos (Figura 01).

Figura 01. Actinomicetos isolados e purificados de uma amostra contaminados por agrotóxicos.



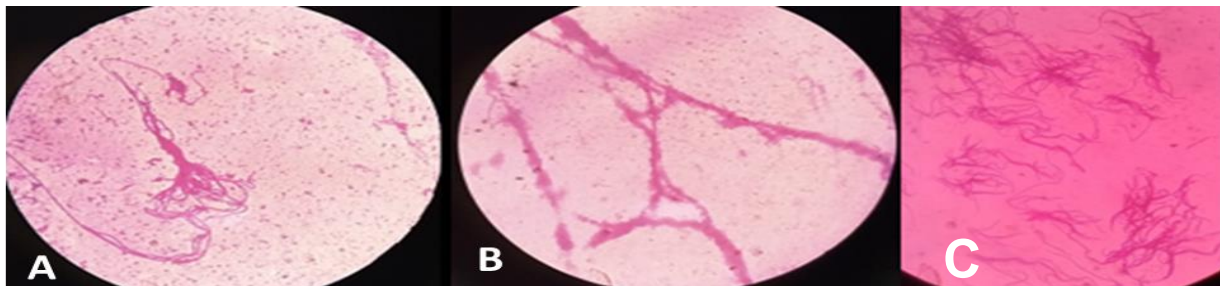
Fonte: autor, 2020

Identificação morfológica dos actinomicetes

Dos dez isolados obteve-se crescimento de sete isolados identificados em três gêneros distintos. As bactérias codificadas como Ac 01, Ac 03, Ac 06 e Ac 10 foram identificadas como *Streptomyces* spp por apresentar emaranhado de hifas, presença de cocos livres e filamentos ondulados. As bactérias codificadas como Ac 5 e Ac 9 foram identificadas como *Streptoverticillium* spp, pois apresentavam hifas septadas sem arranjos de esporos nas extremidades e a bactéria codificada como Ac 8 foi identificada como *Streptosporangio* spp. pois

265 apresentava hifas finas com um saco de esporos na extremidade. (Santos et al.
266 2019)

267 **Figura 02:** Lâminas de microcultivo dos Actinomicetos (A-Ac10, B-Ac 8 e C-ac3)
268 isolados do solo contaminado com agrotóxico.

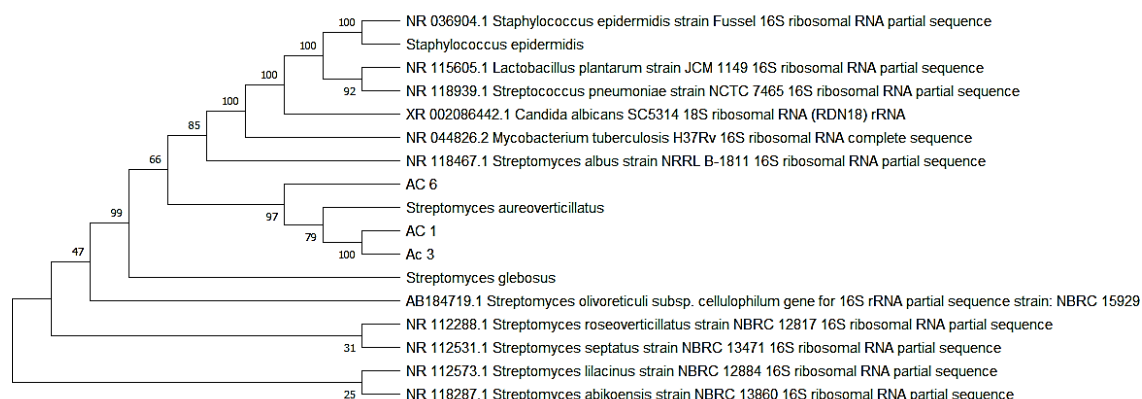


269 **Fonte:** autor, 2020 **Legenda:** Ac- Actinomicetos.

270 **Identificação molecular e árvore filogenética**

271 A região 16S rRNA foi utilizado para obtenção da sequencias de DNA que foram
272 comparadas as depositadas no banco de dados do “Genbank”. Levando em
273 consideração a análise comparativa, os resultados encontrados nesse trabalho
274 apresentam homologia com as sequências do gene 16s rRNA para o gênero
275 *Streptomyces* spp para os três isolados (Ac 1, Ac 3 e Ac 6). Essa mesma
276 sequência foi utilizada para a construção da árvore filogenética utilizando o
277 software de livre acesso chamado de MEGA X apresentado na figura 3.

278 **Figura 03.** Arvore filogenéticas construída a partir da sequência do gene 16S
 279 rRNA, dos *Streptomyces* spp isolados de solo contaminado por agrotóxicos.



280 **Fonte:** autor, 2020; **Legenda:** Ac-Actinomicetos

281 **Teste enzimático**

282 Os isolados de *Streptomyces* spp Ac 1, Ac 3 e Ac 6 foram utilizados para os
 283 ensaios enzimáticos. Esses isolados apresentaram ação de celulase, amilase e
 284 protease como apresentado na tabela 01.

285 **Tabela 01.** Ensaio enzimática (celulase, amilase, protease e lipase) utilizando
 286 Actinomicetos (*Streptomyces* spp) isolados de solo contaminado por
 287 agrotóxicos.

Amostras	Enzimas			
	Celulase	Amilase	Protease	Lipase
AC1	+	+	+	-
AC3	+	+	-	-
AC6	+	+	+	-

288 **Fonte:** Autores,2020; **Legenda:** AC1: Estirpe de Actinomicetos enumerada como 1; AC3: Estirpe de
 289 Actinomicetos enumerada como 3; AC6: Estirpe de Actinomicetos enumerada como 6; + (Positivo) -
 290 (Negativo)

Identificação químicas dos metabolitos secundário

Nos extratos dos metabolitos secundários produzidos pelas amostras Ac 1, Ac 3 e Ac 6 foram identificados compostos como flavonoides, terpenos, alcaloides em maior concentração, como apresentado na tabela 02

Tabela 02: Identificação química dos metabolitos secundários isolados dos extrato de *Streptomyces* spp.

Microrganismos	λ_{vis}	Composto	Leitura (nm)
Ac 1	200 -700	Flavonoides	398
		Terpenos	330
		Alcaloides	237
Ac 3	200 -700	Flavonoides	400
		Terpenos	340
		Alcaloides	210
Ac 6	200 -700	Flavonoides	360
		Terpenos	320
		Alcaloides	260

Fonte: autor, 2021; **Legenda:** λ_{vis} - Comprimento de luz visível

Ensaio em Meio sólido

Os Actinomicetos isolados e identificados foram submetidos ao teste de gelose, com o intuito de verificar se os metabolitos produzidos por esses microrganismos são capazes de inibir o crescimento dos patógenos. O teste de gelose é de caráter qualitativo (Tabela 03). Após a realização do teste observou-se que Ac-1 e Ac -3 apresentaram inibição para todos os patógeno. Já o Ac só formou halos para os patógenos: *S. aureus*, *C. diphterie* e *C. gatii*.

305 **Tabela 03:** Perfil de inibição qualitativo de isolados de actinomicetos contra
 306 patógenos humanos de terminado pelo teste com método bloco em gelose.

Patógeno	Actinomicetos isolados		
	Ac1	Ac 3	Ac 6
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 0023	+	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	+	+	+
<i>C. diphtherie</i> ATCC 27012	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 0026	+	+	-
<i>C. gatii</i> ATCC 24065	+	+	+

307 Fonte: Autor,2020 **Legenda:** actinomicetose Ac; Presença de halo (+); ausência de halo (-)

308 Ensaio de difusão em ágar

309 Os extratos dos isolados apresentam a formação de halos de inibição para quase
 310 todos os microrganismos, exceto o extrato do isolado Ac-1 que não inibiu a *K.*
 311 *pneumoniae* como pode ser observado na tabela 04.

312 **Tabela 04.** Determinação halo de inibição do extrato de acetado de etila de
 313 isolados de Actinomicetos contra patógenos humanos.

Patógenos	Média dos halos formados em mm (desvio padrão)		
	Ac 01	Ac 03	Ac 06
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 0023	-	25,2 +/-0,09	25,5 +/-0,55
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	26,2 +/- 0,59	29,9 +/-0,15	30,5 +/-0,30
<i>C. diphtherie</i> ATCC 27012	27,3 +/- 0,26	19,3 +/-1,07	40,4 +/-0,66
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 0026	25,7 +/-0,70	30,0 +/-0,09	25,1 +/-0,20
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	40,0 +/-0,20	40,5 +/-0,60	41,7 +/-0,40

314 **Fonte:** autor: 2020; **Legenda:** Ac-actinomicetos; ausência de halo (-)

315 **Concentração inibitória mínima**

316 No presente ensaio pode-se perceber que os todos os extratos apresentam ação
 317 inibitória, embora seja em alta concentração. Apenas o extrato do isolado Ac-6
 318 que apresentou um valor baixo para a inibição do patógeno *C. gattii* (Tabela 05)

319 **Tabela 05.** Determinação de concentração inibitória mínima dos extratos de
 320 isolados frente aos patógenos humanos.

CEPAS	ACT1 CIM (µg/mL)	ACT-3 CIM (µg/mL)	ACT-6 CIM (µg/mL)
<i>P. aeruginosa</i> 0026	1000	1000	500
<i>K. pneumoniae</i> :	1000	1000	1000
<i>S. aureus</i>	1000	1000	1000
<i>C. gattii</i>	250	250	125

321 **Fonte:** autor,2020; **Legenda:** Actinomicetos-Ac

Sinergismo

O teste realizado para identificar o sinergismo entre os extratos de *Streptomyces* spp (Ac 1, Ac 3 e Ac 6) e o fluconazol, não apresentou relação, e assim não foi observado ação inibitória potencializada\ com a combinação (Tabela 05)

Tabela 06. Concentração inibitória fracionada do extrato dos metabólitos secundários de Actinomicetes com Fluconazol

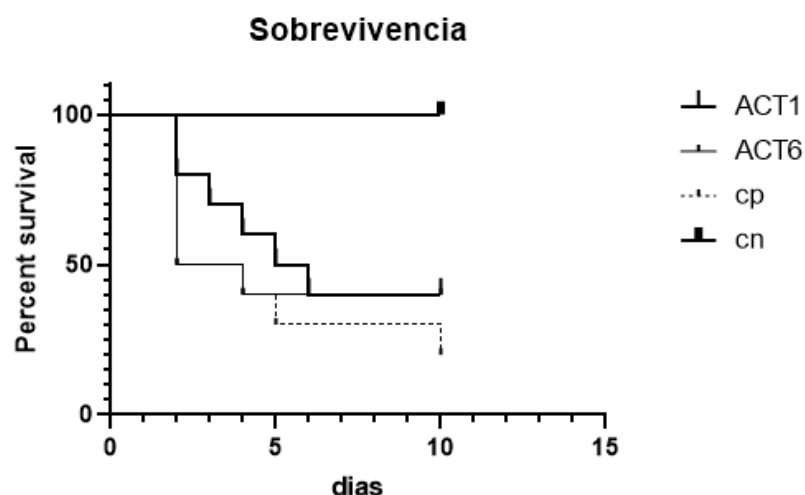
Cepas ^a	CExt ^b MIC(µg/mL)	CFlu ^c MIC(µg/mL)	Ext + Fluc ^d MIC(µg/mL)	FICI ^e	INT ^f
AC1 <i>Streptomyces</i> spp.	125	16	125/16	2,015625	Ind
AC3 <i>Streptomyces</i> spp.	125	16	125/8	1,015625	Ind
AC6 <i>Streptomyces</i> spp.	500	16	250/16	2,003906	Ind

Fonte: autor, 2020 **Legenda:** a Cepas de actinobactérias; b Extrato dos metabólitos secundários e concentração inibitória mínima isolada; c Antifúngico utilizado (Fluconazol) e concentração inibitória mínima isolada; d Combinação do MIC do extrato com o Fluconazol. Ind-indiferente

Teste de Toxidade

Para o ensaio de toxidade utilizando o *Tenebrio molitor*, todos do grupo que usamos de PBS permaneceram vivos os 10 dias já os infectados com inóculo de *C. gatii* morreram 7 e os que foram usados os Ac 01 e Ac 06 morreram 6, realizado o teste estatístico apresentou um $p > 0,05$, assim podemos afirmar que o extrato não tem ação protetiva contra o *C. gatti*.

Figura 04. Teste de toxicidade do extratos acetato de etila utilizando *Tenebrio molitor*.



Fonte: autor, 2021; **Legenda:** ACT-Actinomicetos; cp-controle positivo e cn-controle negativo

Discussão

O solo é um ambiente que apresenta uma grande diversidade de microrganismo, estima-se que a cada grama de solo pode se encontrar de 10^8 até 10^{10} bactérias. Dentre as predominantes encontram-se as da ordem Actinomicetales, que mantêm relações de simbiose, principalmente, com as plantas, onde as mesmas produzem metabolitos com diversas ação biológicas, inclusive antimicrobiana, que podem garantir a proteção dos seus hospedeiros que por sua vez pode garantir proteção e alimento para essas bactérias (KALTENPOTH, 2009).

Dentre as bactérias da ordem Actinomicetales encontradas no solo, predominam as do gênero *Streptomyces*, descritas como um dos mais frequente no solo (SEIPKE; KALTENPOTH; HUTCHINGS, 2012). Essa alta densidade permitiu que neste trabalho fossem isoladas dez cepas de Actinobactérias das quais sete formas identificados, morfologicamente.

As amostras isoladas apresentavam colônia de crescimento lento, aeróbicas, com formação de micélios aéreos. O escurecimento do meio de cultivo sinaliza a excreção de pigmentos indicando a possibilidade de produção de metabolitos secundários, essa característica é comum em bactérias dessa ordem devido a competição pela sobrevivência em um ambiente inóspito como o solo (SHARMA; ANEJA; MAYER; MUNCH et al., 2005). Uma característica peculiar das linhagens dos gêneros *Streptomyces* é a liberação de um odor característico de terra, devido a presença dos metabólitos voláteis denominado geosminas (AGRAWAL, 2002; ARAUJO-MELO; SOUZA; VICALVI-COSTA; DE ARAÚJO et al., 2016).

Em relação as características micromorfológicas das linhagens isoladas se pode observar que todos possuem características equivalentes a gêneros pertencentes a ordem Actinomicetales. Essas características permitem a permanência dessas bactérias no solo, pois contribuem para a produção de compostos importantes na cadeia ecológicas. Além de torná-las interessante do ponto de vista biotecnológico (HWANG; KIM; CHARUSANTI; PALSSON et al., 2014)

Embora a identificação molecular, utilizando o gene 16s rRNA seja muito utilizado, pois apresenta uma alta taxa de conservação dentro da própria espécie sendo um fator importante para a identificação e microrganismo (WEISBURG; BARNS; PELLETIER; LANE, 1991; WOO; LAU; TENG; TSE et al., 2008), neste trabalho com as sequencias obtidas da amplificação do gene 16s rRNA das amostras isoladas não foi possível a identificação das espécies pois apresentou um nível de similaridade abaixo de 90 %. Mas com essas sequencias foi possível

identificar o gênero *Streptomyces* spp, que corroboraram com as análises morfológicas.

Os isolados de *Streptomyces* spp demonstraram potencialidade quanto a produção de enzima amilase sendo secretada por todas as três bactérias testadas (Tabela 1). A enzima amilase exerce um importante papel ecológico pois representa um grupo de compostos capazes de degradar o amido. Apesar das bactérias terem sido isoladas de solo onde ocorre o cultivo de soja, que não contém amido, o fato de estar no solo contribui para a produção desta enzima. Outros autores estudaram a produção de enzimas por bactérias do gênero *Streptomyces*. Minotto (2014), descreveu que além de compostos com capacidade antimicrobiana, imunomoduladores e inibidores de substâncias, a gênero *Streptomyces* sp. também é conhecida por produzirem enzimas extracelulares, fato que corrobora com os atuais resultados (MINOTTO, 2014)

A respeito da utilização dessa enzima, Gopinath et al. (2017) relatam como seu uso na indústria, desde à área alimentícia, para a produção de bebidas e xaropes, na produção têxtil, em detergentes e na área farmacêutica. O autor ainda discorre sobre como a enzima extraída de microrganismos, especialmente de bactérias, como as utilizadas no presente trabalho, são mais fáceis de serem utilizadas com ferramentas da engenharia genética, portanto, podem ser mais elásticas ao que se diz respeito da produção de enzimas mais eficientes e estáveis, a partir da seleção de uma linhagem produtora, e ainda que a própria produção da enzima a partir de espécies bacterianas é considerada mais barata e rápida (GOPINATH; ANBU; ARSHAD; LAKSHMIPRIYA et al., 2017).

Assim como a amilase, todas as estirpes testadas também foram capazes de produzir a enzima celulase (Tabela 1), fortalecendo o que estudos anteriores

propuseram quando descreveram que os actinomicetos apresentam uma alta atividade metabólica, principalmente na produção de enzimas hidrolíticas, que ajudam a degradar a matéria orgânica (LOAIZA; GUERRERO, 2013).

Para o teste de protease, duas linhagens testadas se apresentaram promissoras para a enzima (Tabela 1). Em estudo anterior, Coelho et al. (2017) observou que a espécie *Streptomyces* sp. foi a melhor produtora de enzimas hidrolíticas, incluindo protease (COELHO; BORBA; DE MELO; DA SILVA, 2017). A respeito da sua função nos setores industriais Sawant e Nagendran (2014), descreveram sua grande utilidade na indústria alimentícia e de detergente, e mais precisamente na indústria farmacêutica, onde a enzima advinda de microrganismo pode ser utilizada no tratamento de quadros inflamatórios, distúrbios cardiovasculares, além de serem usadas para aumentarem a concentração de um antibiótico em seu sítio alvo (COELHO; BORBA; DE MELO; DA SILVA, 2017).

A respeito da sua ação, Souza et al. (2015) descrevem que ela atua através da quebra de ligação formada entre os aminoácidos que formam uma proteína, e pode ser classificada de acordo com o local na cadeia proteica que será clivado, são assim classificadas as endopeptidases e exopeptidases, sendo as primeiras capazes de clivarem a molécula na ligação aminoterminal ou carboxiterminal do substrato, já as endopeptidases realizam a clivagem distante dos terminais da molécula (SOUZA; BITTENCOURT; CAPRARA; FREITAS et al., 2015).

A presença dos compostos flavonoides, terpenos, alcaloides em maior concentração nos extratos de acetato de etila podem ajudar a entender sua ação de bioativo. Outros trabalhos já apontam que os isolados mais encontrados nas actinobactérias são os terpenos e alcaloides, resultados esse que se

assemelham ao nosso trabalho. Outros compostos como policetídeos, peptídeos não ribossomais também são encontrados em abundâncias nesse microrganismo (COLLEMARE; O'CONNELL; LEBRUN, 2019).

Os *Streptomyces*, de acordo com o *Dictionary of Natural Products*, estão associados a produção de 219 terpenos e o primeiro terpenoide descrito entre os *Streptomyces* foi a geosminas, um sesquiterpeno. Esse composto já é descrito com ação antimicrobiana (ITABAIANA JR, 2016).

Para selecionar as bactérias promissoras, em relação a atividade biológica, foi realizado um ensaio preliminar quanto a sensibilidade frente a microrganismos patogênicos, utilizando método do bloco de gelose (ICHIKAWA; DATE; ISHIKURA; OZAKI, 1971), o presente trabalho apresentou um amplo espectro de atividade de sensibilidade tanto para bactérias Gram positivo (*S. aureus* e *C. difteria*), Gram-negativo (*k. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) como para o fungo *C. gatti*. Vários trabalhos relatam a ampla capacidade das bactérias da ordem Actinomicetales em produzir compostos ativos, essa atividade está diretamente relacionada com sua morfologia e habitat. O estudo de Silva, (2013) com bioativo de actinobactérias isoladas da rizosfera no bioma da Caatinga avaliou a atividade antimicrobiana de *Streptomyces* contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, os resultados foram semelhantes aos encontrados nossos resultados, primariamente, inibindo assim o crescimento desses microrganismos (SILVA, 2013).

Outros trabalhos como o descrito por Oliveira (2019), que utilizou bioativos de *Streptomyces* spp isolados do solo que inibiram o crescimento de *S. aureus*, e o de Sousa (2019) que mostrou a ação inibitória do extrato de *Streptomyces* sp isolados da Amazônia para fungos, também se assemelham aos nossos (DE

453 SOUSA; DE FARIA LIBERAL; DE SOUSA JÚNIOR; DOS SANTOS et al.;
454 OLIVEIRA)

455 A ação antimicrobiana encontrada nesses isolados, provavelmente, está
456 associado produção de metabolitos secundários. Estes podem ser obtidos
457 realizando a fermentação do *Streptomyces* spp que é capaz de produzir uma
458 grande quantidade de biomassa, que foi posteriormente submetido a uma
459 extração utilizando o acetato de etila para poder realizar o ensaio de ágar difusão
460 ação com a fração de acetato de etila, que é uma fração dos componentes
461 produzidos durante a fermentação. Os ensaios com essa fração são utilizados e
462 bem descrito na leitura (KUMAR; STECHER; LI; KNYAZ et al., 2018; SILVA,
463 2013).

464 O extrato de acetato de etila apresentou resultado semelhante ao teste de bloco
465 de gelose com a inibição dos microrganismos *S. aureus* ATCC 6538 (Gram
466 positivo), *K. pneumoniae* ATCC 0023, *C. diphterie* ATCC 27012, *P. aeruginosa*
467 ATCC 0026 (Gram negativo) e *C. gatii* ATCC 24065 (Fungo). Apresentando
468 halos a partir de 40 mm para fungos e demais com além com diâmetros entre 20
469 mm e 40 mm, esses resultados são muitos promissores e podem ajudar no
470 controle de microrganismo que vem sofrendo mutação e adquirindo resistência
471 aos antimicrobianos ameaçando a saúde mundial (BLAIR; WEBBER; BAYLAY;
472 OGBOLU et al., 2015).

473 No trabalho relatado por Oliveira (2019) foi avaliado o potencial antimicrobiano
474 de actinobactérias isoladas de ilhas oceânicas da fração acetato de etila. Ela
475 observou que seus isolados produziam compostos que inibiram o crescimento
476 de *S. aureus* (≥ 16 mm), outros *Staphylococcus* e *Escherichia coli*. Em comparação

477 a esse trabalho, os extratos dos *Streptomyces* deste trabalho, apresentaram
478 resultado mais promissores com a formação de halos de até 30 mm (OLIVEIRA).

479 Os achados apresentados têm grande importância para a saúde mundial, pois o
480 uso indiscriminado, a décadas, de antimicrobiano foi favorável a seleção natural
481 de indivíduos resistente a maior parte do arsenal de antimicrobiano produzidos
482 e disponíveis no mercado para conter as infecções microbianas (BLAIR;
483 WEBBER; BAYLAY; OGBOLU et al., 2015). As comprovações das ações
484 inibitórias, dos extratos em estudo, ajudarão a aumentar o arsenal de armas para
485 combater os microrganismos patogênicos resistente e multirresistente.

486 Além da comprovação, da ação inibitória dos extratos de etila no ensaio de ágar
487 difusão, verificamos concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos do
488 bioativos isolados dos *Streptomyces* spp estudados. Dentre eles o CIM para *C.*
489 *gatti* para os três extratos apresentou valores $\leq 250\mu\text{g/mL}$. Na literatura são
490 descritos vários trabalhos que comprovam ação antifúngicas de extratos de
491 *Streptomyces* spp., principalmente para fitopatógenos e *Cadida* spp.

492 Maciejewska et al (2016), estudou o potencial antimicrobianos de 76 isolados
493 exclusivamente do gênero de *Streptomyces*. Os isolados testados apresentaram
494 atividades inibitórias contra as estirpes de fungos, com 84% sendo
495 especificamente ativa contra *Penicillium chrysogenum*, 77% contra *Aspergillus*
496 *fumigatus*, 94% contra *Rasamsonia argillacea*, 65% contra *Trichophyton*
497 *mentagrophytes*, e 52% ativo contra ambas *Candida albicans* e a sua estirpe
498 resistente à droga, *C. albicans* R (MACIEJEWSKA; ADAM; MARTINET; NAÔMÉ
499 et al., 2016).

500 Já Lima (2017) em seu trabalho com bioprospecção de compostos produzidos
501 por *Streptomyces* spp. isolados da região amazônica com potencial
502 biotecnológico mostrou que todos os seus extratos provenientes da fermentação
503 de *Streptomyces* apresentaram a atividade frente a leveduras com CIM
504 $\geq 31,25 \mu\text{g/mL}$ contra as espécies duas espécies *Candida krusei* e *Candida*
505 *albicans* utilizando fração de acetato de etila e o extrato metanólico apresentou
506 CIM $\geq 7,81 \mu\text{g/mL}$ (LIMA, 2017).

507 Apesar da literatura já ter relatado ação antifúngicas de muitos metabolitos de
508 *Streptomyces* spp como nos trabalhos de Maciejewska et al (2016) e Lima
509 (2017), ainda não foi relatado ação inibitória contra o *C. gatii* ATCC 24065, sendo
510 o nosso trabalho os primeiros a fazer essa descrição (LIMA, 2017;
511 MACIEJEWSKA; ADAM; MARTINET; NAÔMÉ et al., 2016).

512 O solo apresenta uma biodiversidade vasta, contendo uma infinidade de
513 microrganismos, com predomínio dos *Streptomyces* que por sua vez são
514 grandes produtores de bioativos com ações biológicas múltiplas, principalmente
515 ação antimicrobiana. Pois elas necessitam desses bioativos para garantirem sua
516 presença nos seus habitats, promovendo a eliminação dos outros
517 microrganismos competidores.

4. CONCLUSÃO

Portanto, no presente trabalho foram isolados *Streptomyces* que produziram compostos bioativos com grande atividade biológicas, ação antimicrobiana principalmente contra o *Cryptococcus gatii*, produção de enzimas (Amilase, protease e lipase) além outros compostos (terpeno e flavonoides). A identificação dessas ações biológicas são importantes para desenvolvimentos de produtos biotecnológicos.

5. REFERENCIA

AGRAWAL, V. Biodiversity of Khumbu region: population study of actinomycetes. **Submitted to Royal Nepal Academy for Science and Technology**, 2002.

AGUIAR, S.; SANTOS, I. D. S.; ARÊDES, N.; SILVA, S. Biome-networks: Information and communication for sociopolitical action in eco-regions. **Ambiente & sociedade**, 19, n. 3, p. 231-248, 2016.

ANTUNES, T. C.; SALAMONI, S. P.; FRAZZON, A. P. G.; GERMANI, J. C. *et al.* Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. **Revista Brasileira de Biociências**, 11, n. 2, 2013.

ARAUJO-MELO, R. d. O.; SOUZA, I. F.; VICALVI-COSTA, M. C.; DE ARAÚJO, J. M. *et al.* Actinobacteria: Versatile Microorganisms with Medical and Pharmaceutical Application. **Biotechnology Journal International**, p. 1-13, 2016.

BARÇA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N. *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BERNOUX, M.; VOLKOFF, B. Soil carbon stocks in soil ecoregions of Latin America. 2006.

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BRAÑA, A. F.; FIEDLER, H.-P.; NAVA, H.; GONZÁLEZ, V. *et al.* Two *Streptomyces* species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the central Cantabrian Sea. **Microbial ecology**, 69, n. 3, p. 512-524, 2015.

COELHO, L. V. A.; BORBA, C. B. A.; DE MELO, E. J. V.; DA SILVA, L. A. d. O. O potencial de *Streptomyces* isolados na região de maués na produção de enzimas hidrolíticas. **Ciência e Natura**, 39, n. 2, p. 202-210, 2017.

COLLEMARE, J.; O'CONNELL, R.; LEBRUN, M. H. Nonproteinaceous effectors: the terra incognita of plant–fungal interactions. **New Phytologist**, 223, n. 2, p. 590-596, 2019.

COSTA, Monteiro; AGUIAR, Ada Cristina Pontes. Ecocídio nos Cerrados: agronegócio, espoliação das águas e contaminação por agrotóxicos.

Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Res**, 46, n. D1, p. D8-d13, Jan 4 2018.

DE SOUSA, S. F.; DE FARIA LIBERAL, T. C.; DE SOUSA JÚNIOR, J. J. V.; DOS SANTOS, B. V. L. *et al.* Streptomyces sp. isolados da Amazônia como agentes de biocontrole de fungos aflatoxigênicos. **Diversidade Microbiana da Amazônia**, p. 46.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, 62, n. 1, p. 5-16, 2009.

DING, C.; JIANG, Z.; LI, X.; LI, L. *et al.* High activity xylanase production by Streptomyces olivaceoviridis E-86. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20, n. 1, p. 7-10, 2004.

DUARTE, M. W. Identificação de actinomicetos isolados de solo impactado com resíduos petroquímicos e seleção de potenciais degradadores de misturas de diesel e biodiesel. 2012.

DUBEY, S. K.; TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S. N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. **Bioresource Technology**, 97, n. 17, p. 2217-2224, 2006.

FRANCO, J. L. d. A. O conceito de biodiversidade e a história da biologia da conservação: da preservação da wilderness à conservação da biodiversidade. 2013.

GAO, X.; LU, Y.; XING, Y.; MA, Y. *et al.* A novel anticancer and antifungus phenazine derivative from a marine actinomycete BM-17. **Microbiological research**, 167, n. 10, p. 616-622, 2012.

GOPINATH, S. C.; ANBU, P.; ARSHAD, M. M.; LAKSHMIPRIYA, T. *et al.* Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed research international**, 2017, 2017.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. Bergey's manual of determinative bacteriology. 1994.

HOSTER, F.; SCHMITZ, J. E.; DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel Streptomyces strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 66, n. 4, p. 434-442, 2005.

HUDZICKI, J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. 2009.

HWANG, K.-S.; KIM, H. U.; CHARUSANTI, P.; PALSSON, B. Ø. *et al.* Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology advances**, 32, n. 2, p. 255-268, 2014.

IBEKWE, A. M.; PAPIERNIK, S. K.; YANG, C.-H. Enrichment and molecular characterization of chloropicrin-and metam-sodium-degrading microbial communities. **Applied microbiology and biotechnology**, 66, n. 3, p. 325-332, 2004.

IBGE, D. d. P. Coordenação de População e Indicadores Sociais. **Estimativas da população residente com data de referência 1º de julho de, 2017.**

ICHIKAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia microbiologica**, 16, n. 3, p. 218-224, 1971.

INBAR, E.; GREEN, S. J.; HADAR, Y.; MINZ, D. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomycetes. **Microbial ecology**, 50, n. 1, p. 73-81, 2005.

ITABAIANA JR, I. **Biocatálise e biotransformação-fundamentos e aplicações: Quarta Série de Textos do Workshop de Biocatálise e Biotransformação.** Simplissimo Livros Ltda, 2016. 858245385X.

JESUS, H. C. R. d. Estudos estruturais de policetídeos sintases guiados por ligação cruzada acoplada a espectrometria de massas. 2016.

KALTENPOTH, M. Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? **Trends Microbiol**, 17, n. 12, p. 529-535, Dec 2009.

KASHIWAGI, N.; OGINO, C.; KONDO, A. Production of chemicals and proteins using biomass-derived substrates from a *Streptomyces* host. **Bioresource technology**, 245, p. 1655-1663, 2017.

KONEMAN, E.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W. *et al.* Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. *In: Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*, 2012. p. xxxv, 1565-xxxv, 1565.

KRIES, H. Biosynthetic engineering of nonribosomal peptide synthetases. **Journal of Peptide Science**, 22, n. 9, p. 564-570, 2016.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C. *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

LEE, S.-W.; WON, K.; LIM, H. K.; KIM, J.-C. *et al.* Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, 65, n. 6, p. 720-726, 2004.

LEPSCH, I. F. **Formação e conservação dos solos**. Oficina de textos, 2016. 8579752310.

LIMA, S. M. d. A. Bioprospecção de compostos produzidos por *Streptomyces* spp. isolados da região amazônica com potencial biotecnológico. 2017.

LIMA, Camila Correa; BENJAMIM, Sandra Cristina Calixto; SANTOS, Rosana Francisco Siqueira dos. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. *CuidArte, Enferm*, p. 105-113, 2017.

LOAIZA, A. M. S.; GUERRERO, C. A. O. **Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira**. 2013. -, Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Química Industrial.

LUCKARIFT, H. R.; DALTON, H.; SHARMA, N. D.; BOYD, D. R. *et al.* Isolation and characterisation of bacterial strains containing enantioselective DMSO reductase activity: application to the kinetic resolution of racemic sulfoxides. **Applied microbiology and biotechnology**, 65, n. 6, p. 678-685, 2004.

MACIEJEWSKA, M.; ADAM, D.; MARTINET, L.; NAÔMÉ, A. *et al.* A phenotypic and genotypic analysis of the antimicrobial potential of cultivable *Streptomyces* isolated from cave moonmilk deposits. **Frontiers in microbiology**, 7, p. 1455, 2016.

MADIGAN, M. T. **Mikroorganizmaların biyolojisi**. Palme Yayıncılık, 2010. 6055829622.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H. *et al.* **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016. 8582712987.

MASKEY, R. P.; LI, F. C.; QIN, S.; FIEBIG, H. H. *et al.* Chandrananimycins AC: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. **The Journal of antibiotics**, 56, n. 7, p. 622-629, 2003.

MAYR, E.; PROVINE, W. B. **The evolutionary synthesis: perspectives on the unification of biology**. Harvard University Press, 1998. 0674272269.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review. **Gene**, 115, n. 1-2, p. 189-192, 1992.

MEINE, C.; SOULÉ, M.; NOSS, R. F. “A mission-driven discipline”: the growth of conservation biology. **Conservation biology**, 20, n. 3, p. 631-651, 2006.

MINOTTO, E. Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. 2014.

MOHANRAJ, G.; SEKAR, T. Isolation and screening of actinomycetes from marine sediments for their potential to produce antimicrobials. **Int J Life Sci Pharma Res**, 2, n. 12, p. 115-126, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Antitumor compounds from marine actinomycetes. **Marine drugs**, 7, n. 2, p. 210-248, 2009.

OLIVEIRA, L.; FERRARINI, M.; DOS SANTOS, A. P.; VARELA, M. T. *et al.* Coumaric acid analogues inhibit growth and melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans* and potentialize amphotericin B antifungal activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 105473, 2020.

OLIVEIRA, L. F. P. d. **Potencial antimicrobiano e identificação molecular de actinobactérias isoladas de ilhas oceânicas.** -, Universidade de São Paulo.

PELCZAR, M. J. Microbiologia-Conceitos e aplicações, 2^a. : Ed 1997.

PEREIRA, A. S. Diversidade e potencial para a produção de enzimas de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* isolados de solo de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero. 2019.

PETROSYAN, P.; GARCÍA-VARELA, M.; LUZ-MADRIGAL, A.; HUITRON, C. *et al.* *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 53, n. 1, p. 269-273, 2003.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B. *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed research international**, 2014, 2014.

RAJA, A.; PRABAKARANA, P. Actinomycetes and drug-an overview. **American Journal of Drug Discovery and Development**, 1, n. 2, p. 75-84, 2011.

SANTOS, João Soares *et al.* 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. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 10, p. 101616-101635, 2021.

SARKAR, S. Defining “biodiversity”; assessing biodiversity. **The Monist**, 85, n. 1, p. 131-155, 2002.

SEGARAN, G.; SUNDAR, R. D. V.; SETTU, S.; SHANKAR, S. *et al.* A Review on Endophytic Actinomycetes and their Applications. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 9, n. 10, p. 152-158, 2017.

SEIPKE, R. F.; KALTENPOTH, M.; HUTCHINGS, M. I. Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme? **FEMS Microbiol Rev**, 36, n. 4, p. 862-876, Jul 2012.

SHARMA, S.; ANEJA, M. K.; MAYER, J.; MUNCH, J. C. *et al.* Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. **Microbial Ecology**, 49, n. 3, p. 407-415, 2005.

SHIMIZU, Y.; OGATA, H.; GOTO, S. Type III polyketide synthases: functional classification and phylogenomics. **ChemBioChem**, 18, n. 1, p. 50-65, 2017.

SHIRLING, E.; GOTTLIEB, D., 1970, **International Streptomyces Project: experience in developing a collection of type strains**.

SILVA, F. B.; SANTOS, J. R. N.; FEITOSA, F. E. C. S.; SILVA, I. D. C. *et al.* Evidências de mudanças climáticas na região de transição Amazônia-Cerrado no Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Meteorologia**, 31, n. 3, p. 330-336, 2016.

SILVA, G. R. d. **Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma Caatinga**. 2013. -, Universidade Federal de Pernambuco.

SOUZA, N. F. Avaliação da estabilidade de óleos e gorduras. 2018.

SOUZA, P. M. d.; BITTENCOURT, M. L. d. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M. d. *et al.* A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

TAN, L. T.-H.; CHAN, K.-G.; CHAN, C. K.; KHAN, T. M. *et al.* Antioxidative potential of a Streptomyces sp. MUM292 isolated from mangrove soil. **BioMed Research International**, 2018, 2018.

VALLI, M.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. A Beleza Invisível da Biodiversidade: O Táxon Rubiaceae. **Revista Virtual de Química**, 8, n. 1, p. 296-310, 2016.

VEIGA, M.; ESPARIS, A.; FABREGAS, J. Isolation of cellulolytic actinomycetes from marine sediments. **Applied and environmental microbiology**, 46, n. 1, p. 286, 1983.

WALSH, C. T. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. **Science**, 303, n. 5665, p. 1805-1810, 2004.

WANNER, L. A.; HAYNES, K. G. Aggressiveness of Streptomyces on four potato cultivars and implications for common scab resistance breeding. **American Journal of Potato Research**, 86, n. 5, p. 335-346, 2009.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol**, 173, n. 2, p. 697-703, Jan 1991.

WILSON, E. O. Biodiversidade. **Rio de Janeiro: Nova Fronteira**, p. 137-152, 1997.

WOO, P.; LAU, S.; TENG, J.; TSE, H. *et al.* Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, 14, n. 10, p. 908-934, 2008.

YUN, J.; KANG, S.; PARK, S.; YOON, H. *et al.* Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, n. 12, p. 7229-7235, 2004.

ZHANG, H.; KALLIMANIS, A.; KOUKKOU, A. I.; DRAINAS, C. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65, n. 1, p. 124-131, 2004.

Anexo

SAÚDE E AMBIENTE

V.8 • N.2 • 2020 - Fluxo Contínuo

ISSN Digital: 2316-3798

ISSN Impresso: 2316-3313

DOI: 10.17564/2316-3798.2020v8n2



POTENCIAL DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ACTINOMICETOS CONTRA O FUNGO *CRYPTOCOCCUS GATTII*

POTENTIAL OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF ACTINOMICETES
AGAINST THE FUNGUS *CRYPTOCOCCUS GATTII*

POTENCIAL DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ACTINOMICETOS
CONTRA EL HONGO *CRYPTOCOCCUS GATTII*

Suelem dos Santos Amaral¹

Ana Célia Rodrigues da Silva e Silva²

Luiz Alfredo Torres Sales³

Camila Silva Alves⁴

Rita de Cássia Mendonça de Miranda⁵

Luiz Claudio Silva Nascimento⁶

Matheus Silva Alves⁷

RESUMO

Actinomicetos são bactérias gram-positivas que apresentam crescimento filamentoso. Essas bactérias se destacam pela produção variada de substâncias bioativas que podem apresentar ação antimicrobiana, sendo muito utilizados na indústria farmacêutica para a produção de antimicrobiano. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial de inibição contra *Cryptococcus gattii* a partir de actinomicetos isolados do solo da região de Balsas, estado do Maranhão. Para isolamento das bactérias, as amostras de solo foram sujeitas a diluições seriadas em meios de cultura convencionais, obtendo-se após um período, o crescimento de colônias correspondentes, identificadas e enumeradas. Para caracterização das espécies de actinomicetos isoladas, realizou-se a técnica de microcultivo, e para análise da ação antifúngica dessas bactérias, foram realizados ensaios de sensibilidade pela técnica em bloco de gelose frente ao fungo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Foram isoladas 10 cepas de actinomicetos, e dentre elas apenas três apresentaram a formação de halo de inibição com média de 38,1mm, 41,6mm e 40mm, indicando possível ação antifúngica. Para identificação das espécies de actinomicetos que apresentaram ação, realizou-se a técnica de microcultivo, onde foi possível observar espécies de *Streptomyces* e *Streptosporangium*. Portanto a pesquisa é de suma importância, uma vez que este fungo é causador da criptococose, patologia associada à saúde pública. Tendo em vista que os medicamentos sintéticos presentes no mercado vêm apresentando incapacidade de combater esses patógenos.

PALAVRAS-CHAVE

Isolamento, actinomicetos, sensibilidade, controle biológico, bioprospecção.

ABSTRACT

Actinomycetes are gram-positive bacteria that show filamentous growth. These bacteria are distinguished by the varied production of bioactive substances that can present antimicrobial action, being very used in the pharmaceutical industry for the production of antimicrobial. In this way, the objective of this work is to evaluate the inhibition potential against *Cryptococcus gattii* from actinomycetes isolated from the soil of the Balsas region, Maranhão state. For isolation of the bacteria, the soil samples were subjected to serial dilutions in conventional culture media, obtaining, after a period, the growth of corresponding colonies, identified and enumerated. For the characterization of the species of actinomycetes isolated, the microculture technique was performed, and for analysis of the antifungal action of these bacteria, sensitivity tests were carried out by the block agar technique against the fungus *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Ten strains were isolated among them, only three presented the formation of inhibition halo with a mean of 38.1mm, 41.6mm and 40mm, indicating possible antifungal action. In order to identify the species of actinomycetes that showed action, the microculture technique was used, where it was possible to observe species of *Streptomyces* and *Streptosporangium*. Therefore the research is of paramount importance, since this fungus causes cryptococcosis, a pathology associated with public health. Considering that the synthetic drugs present in the market have been unable to combat these pathogens.

KEYWORDS

Isolation, Actinomycetes, Sensitivity, Biological Control, Bioprospecting.

RESUMEN

Los actinomicetos son bacterias gram positivas que muestran un crecimiento filamentosos y se distinguen por la producción variada de sustancias bioactivas que pueden presentar una acción antimicrobiana, siendo muy utilizadas en la industria farmacéutica para la producción de antimicrobianos. De esta manera, el objetivo de este trabajo es evaluar el potencial de inhibición contra *Cryptococcus gattii* de actinomicetos aislados del suelo de la región de Balsas, estado de Maranhão. Para el aislamiento de las bacterias, se hizo

diluciones seriadas de las muestras de suelo, en medios de cultivo convencionales, obteniendo, después de un período, el crecimiento de las colonias correspondientes, identificadas y enumeradas. Para la caracterización de las especies de actinomicetos aislados, se realizó la técnica de microcultivo, y para el análisis de la acción antifúngica de estas bacterias, se realizaron pruebas de sensibilidad mediante la técnica del bloqueo de agar contra el hongo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Diez cepas fueron aisladas y, entre ellas, solo tres presentaron la formación de halo de inhibición con una media de 38,1 mm, 41,6 mm y 40 mm, lo que indica una posible acción antifúngica. Para identificar las especies de actinomicetos que mostraron acción, se utilizó la técnica de microcultivo, donde fue posible observar especies de *Streptomyces* y *Streptosporangium*. Por lo tanto, la investigación es de suma importancia, ya que este hongo causa la criptococosis, una patología asociada con la salud pública. Teniendo en cuenta que las drogas sintéticas presentes en el mercado no han podido combatir estos patógenos.

PALABRAS CLAVE

Aislamiento, actinomicetos, sensibilidad, control biológico, bioprospección.

1 INTRODUÇÃO

Os Actinomicetos são bactérias que apresentam em sua estrutura uma membrana fosfolipídica e camadas espessas de peptidoglicano, caracterizando-as como Gram-positivas, contendo ainda em seu genoma altas concentrações de citosina e guanina. Durante algum tempo essas bactérias foram caracterizadas por alguns pesquisadores como fungo, devido ao seu crescimento filamentosso, além da produção de micélio de substratos, micélio aéreo e esporos, o que confere a esta classe resistência e sobrevivência em diversos habitats, como água, animais, pedras, plantação e principalmente o solo (HOLT *et al.*, 1994; SATHEEJA; JEUMAR, 2011). Dentre as espécies mais comumente isoladas, encontra-se o *Streptomyces*, onde, segundo Kennedy (1999), 30% da microbiota do solo corresponde a actinomicetos.

Essas bactérias se destacam pela produção variada de metabólitos secundários, apresentando ação que auxiliam no combate de patógenos, bactérias e fungos. São microrganismos endofíticos, podendo ser a maioria aeróbia, apresentando crescimento relativamente lento.

Destacam-se pela habilidade em produzir compostos bioativos, como a produção de sistemas enzimáticos, síntese de substâncias e antagonismo a outros microrganismos, sendo realizadas atividades como competição por espaço, lesão e/ou destruição de outros (KENNEDY, 1999; LACAZ *et al.*, 2002). Devido a isso, essas bactérias são atualmente muito utilizadas na indústria farmacêutica na produção de antibióticos e antifúngicos, com o intuito de combater patógenos, bactérias e fungos (CHALLIS; HOPWOOD, 2003; MAHESHWARI *et al.*, 2010).

Infecções fúngicas vêm mantendo um aumento significativo, sendo causadas por patógenos que utilizam os seres humanos como hospedeiros. Essas infecções são classificadas em primárias, que se

desenvolvem em imunocompetentes e oportunistas, manifestando-se em indivíduos imunocomprometidos (REVANKAR, 2017)

O *Cryptococcus gattii* é uma levedura encapsulada, de caráter patogênico limitado a certas regiões tropicais e subtropicais, havendo relatos de isolamento desses fungos em espécies de eucalipto e mais recentemente em ocos de oiti (LAZÉRA *et al.*, 1998; PASSONI, 1999). Esta espécie causa doenças em vários mamíferos, a exemplo destaca-se a criptococose, considerada uma doença que atinge tanto imunossuprimidos como imunocompetentes. É adquirida através da inalação do agente, que em humanos pode causar infecção pulmonar frequentemente fatal, além do caso clínico mais grave quando esta atinge o sistema nervoso central, fazendo com que a meningite criptocócica se torne a principal manifestação clínica (KWON-CHUNG *et al.*, 2000; LACAZ *et al.*, 2002).

Os fatores predisponentes que podem levar à infecção criptocócica podem ser desenvolvidos a partir de imunodeficiência celular, como por exemplo, pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), uso de imunossupressores em transplantados, corticoterapia leucemias e outras doenças hematológicas. Outros fatores são a diabetes e cirrose hepática (LEIMANN; KOIFMAN, 2008). Devido a isso, as infecções requerem, geralmente, longos períodos de terapia com antifúngicos, e esses esquemas terapêuticos podem vir a promover a resistência desses patógenos a esta classe de medicamentos.

Em virtude disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de inibição do fungo *Cryptococcus gattii* a partir de actinomicetos isolados do solo em um município do estado do Maranhão.

2 MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO

Para a técnica de isolamento de actinomicetos, foi elaborada uma coleta de 10 pontos equidistantes em cultura de soja localizada em Balsas-MA, Brasil. Em seguida, coletou-se 1g de amostra do solo de cada ponto e obteve-se uma mistura composta de 10 g. Tal amostra foi suspendida em 90 mL de soro fisiológico 0,9% e homogeneizado em agitador de frascos Erlenmeyer. Após 1 hora em agitação, as amostras de solo foram submetidas a diluições seriadas decimais até o fator de diluição 10^{-5} .

Em seguida, alíquotas de 100 μ L das diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram inoculadas em triplicata na superfície de placas de Petri por meio do espalhamento com alça de Drigalski. Os meios de cultura utilizados foram: *Ágar-Sabouraud-Dextrose* (SAB), *Ágar-Batata-Dextrose* (BDA) e *Ágar-Czapek-Dox* (CZA). As placas foram incubadas a 28°C em estufa de B.O.D por 5 dias. Após a incubação, as amostras foram selecionadas e purificadas de acordo com a sua estrutura morfológica de crescimento.

2.2 TESTE DE GELOSE

O teste de sensibilidade em meio sólido foi realizado com o fungo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Para o teste de gelose (ICHIKAWA *et al.*, 1971), utilizou-se 1 mL da suspensão de cada patógeno, diluí-

dos em escala de MacFarland e semeados em placas, contendo meio de cultura Ágar Müller-Hinton. Após este, retirou-se as colônias de actinomicetos cortadas de forma esférica, em blocos (discos com micélio de aproximadamente 5 mm de diâmetro) e adicionadas em triplicata à placa, contendo o patógeno. Em seguida, as amostras foram armazenadas em estufa B.O.D a 28°C por um período de 36 horas, posteriormente feita a análise da ação dos actinomicetos por meio da formação do halo de inibição, sendo os diâmetros medidos e retirados o desvio padrão.

2.3 MICROCULTIVO

Para a análise das estruturas morfológicas, foram preparadas placas de cultura com o meio *Ágar-Batata-Dextrose* (BDA). Por conseguinte, foi colocado nas placas os blocos de gelose das cepas de interesse, juntamente com uma lamínula sobreposta, utilizando-se a metodologia adaptada de Koneman e colaboradores (2001). As placas foram incubadas a 28°C em estufa de B.O.D por 5 dias. Após o período de incubação, a lamínula foi corada com solução azul de lactofenol e visualizada no microscópio pela objetiva x100.

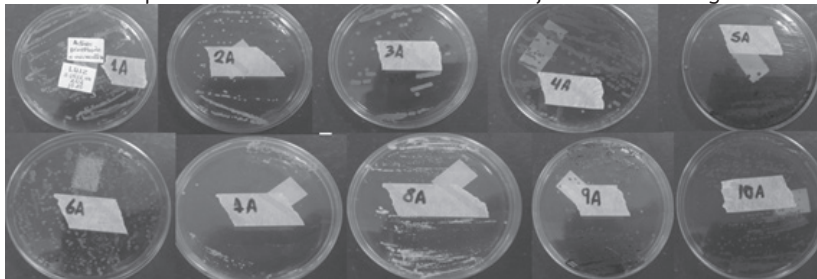
3 RESULTADOS

Foram testadas 10 isolados diferentes de actinomicetos obtidos do solo de cultivo de soja que faz uso de agrotóxicos. Esses microrganismos isolados foram testados contra o fungo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065.

3.1 ISOLAMENTO

A amostra de isolados do solo apresentou uma grande diversidade de microrganismo, fazendo-se necessário o uso de meios de cultura específicos para isolar apenas colônias de actinomicetos. Com a purificação foram obtidas dez cepas de actinomicetos. Estes apresentando diversidade quanto à produção de pigmentos e estruturas (FIGURA 1).

Figura 1 – Actinomicetos purificados do solo de cultivo de soja com uso de agrotóxicos



Fonte: Dados da pesquisa

3.2 MICROCULTIVO

No teste do microcultivo, dos dez isolados conseguimos identificar setes gêneros que foram: 1A-*Streptosporangium* sp; 3A-*Streptomyces* sp; 5A-*Streptovercillium* sp.; 6A-*Streptomyces* sp;8A-*Streptosporangium* sp.; 9A-*Streptovercillium* sp. 10A-*Streptomyces* sp. (Tabela 1). As demais não obtiveram crescimento.

Tabela 1 – Gêneros de Actinomicetos identificadas por meio da técnica de microcultivo

Identificação	Gênero
AC1	<i>Streptosporangium</i> sp.
AC3	<i>Streptomyces</i> sp.
AC5	<i>Streptovercillium</i> sp.
AC6	<i>Streptomyces</i> sp.
AC8	<i>Streptosporangium</i> sp.
AC9	<i>Streptovercillium</i> sp.
AC10	<i>Streptomyces</i> sp.

Legenda: (AC) Actinomicetos

Fonte: Dados da pesquisa

3.3 TESTE DE GELOSE

Os actinomicetos isolados e identificados foram submetidos ao teste de gelose, com o intuito de verificar se os metabolitos produzidos por esses microrganismos são capazes de inibir o crescimento do fungo *Cryptococcus gattii*, obtendo-se resultados qualitativos (TABELA 2).

Tabela 2 – Perfil do potencial de inibição das cepas de actinomicetos sobre o fungo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065

	AC1	AC2	AC3	AC5	AC6	AC8	AC9	AC10
CG24065	+	-	+	-	+	-	-	-

(+) apresentou inibição; (-) ausência de inibição; (AC) Actinomicetos; (CG24065) *Cryptococcus gattii* ATCC

Fonte: Dados da pesquisa

Para as estripes de actinomicetos que apresentaram formação de halo de inibição foram realizadas medidas deles, onde as médias de diâmetro dos halos apresentaram os seguintes valores: AC1 de 38,1 mm, AC3 de 41,6 mm e AC6 de 40,0 mm, como apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Formação dos halos de inibição medidos em diâmetro (mm), média aritmética e desvio padrão para o fungo *Cryptococcus gattii*

	Média Aritmética	Desvio Padrão
AC1	38,1	± 2.88
AC3	41,6	± 2.88
AC6	40	0.0

Legenda: (+/-) Margem de erro para mais e menos; (AC) Actinomicetos.

Fonte: Dados da pesquisa

4 DISCUSSÃO

Actinomicetos vêm se apresentando como uma importante fonte de substâncias bioativas, principalmente por sua ação antimicrobiana, acarretando tanto no combate a microrganismos que durante as últimas décadas apresentaram resistência aos antibióticos presentes no mercado, quanto a sua utilização para a promoção à saúde pública (ASOLKAR *et al.*, 2010). A diversidade química e mecanicista do antibacteriano natural tem proporcionado produtos privilegiados para o desenvolvimento de medicamentos (LOPES *et al.*, 2011).

Streptomyces sp. e *Streptosporangium sp.* fazem parte do Filo dos Actinomicetos. De acordo com alguns autores, o *Streptomyces* é um microrganismo com grande potencial de produção de metabólitos com ação antimicrobiana, no qual já foram isolados e descritos por pesquisadores.

Segundo Miyauchi (2012), em estudos realizados com actinomicetos isolados do rizosfera de Araucária, obteve-se um potencial de inibição de cerca de 25% no controle da atividade do fungo *Fusarium sp.* Silva (2014) avaliou a atividade antagonica do gênero *Streptomyces sp.* no biocontrole do fungo *Botrytis cinerea*, em cerca de 72% no período de sete dias. Podemos citar os metabólitos envolvidos a Platensimicina e Platencina (WANG *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007), Lucensimycina (SINGH *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2008), Okilactomycins (GENILLOUD, 2017), Krysinomycin (BROWN *et al.*, 2014) todos já testados e comprovados sua ação antimicrobiana e, portanto, usados como antibióticos.

Além da ação bactericida e bacteriostática desses metabólitos, em estudos com fungos também foram verificados a ação antifúngica com os compostos 210 A (WU *et al.*, 2009) e a fungicromina (WEI *et al.*, 2011). Esses trabalhos ajudam a corroborar os nossos resultados que apresentaram ação metabólica de inibição contra a estirpe de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Não há ainda estudos anteriores que tenham realizados ensaios com esses metabólitos. Sendo necessário que se realizem mais estudo para que se possam isolar esses componentes e identificar a sua atuação no *Cryptococcus gattii*, a fim de combater esse perigoso patógeno que está disperso pelo meio ambiente, podendo vir a ser letal para os humanos.

Trabalhos realizados com *Streptosporangium sp.*, isolados de solos apresentaram atividade antifúngica e essa atividade está relacionada com a iodinina, que curiosamente é produzido apenas por essa espécie de actinomicetos, onde nenhum outro é capaz de produzir esse composto (LAURSEN; NIELSEN, 2004).

Assim, o trabalho de Laursen e Nielsen ajudam a confirmar nossos achados e permitem nos direcionar na seleção do bioativo que está associado à ação fungicida dos *Streptosporangium sp.*, assim apresentando a iodina como possível agente fungicida. Porém são necessários mais estudos, tais como isolamentos e identificação dessas substâncias para obtenção de resultados que venham confirmar o mesmo efeito a partir da ação isolada.

5 CONCLUSÃO

Portanto, neste trabalho iniciamos os estudos de ação fungicidas dos metabólitos contra o fungo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065, fazendo-se necessário estudos mais aprofundados que busquem identificar as biomoléculas capazes de minimizar o efeito desse patógeno e assim promover a saúde coletiva, aumentando o arsenal de combate aos microrganismos patogênicos.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BROWN, D. G. *et al.* New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, n. 2, p. 413-418, 2014.
- CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, p. 14555-14561, 2003.
- GENILLOUD, O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. **Nat. Prod. Rep.**, v. 34, n. 10, p. 1203-1232, 2017.
- HOLT, J. G. *et al.* **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- ICHIKAWA, T. *et al.* A. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 218-224, 1971.
- KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agr. Ecosyst. Environ.**, v. 74, n. 1-3, p. 65-76, 1999

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2008

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* Cryptococcosis: clinical and biological aspects. **Med. Mycol.**, v. 38, suppl. 1, p. 205-213, 2000.

LACAZ, C. S. *et al.* **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAURSEN, J. B.; NIELSEN, J. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. **Chem. Rev.**, v. 104, n. 3, p. 1663-1686, 2004.

LAZÉRA, M. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 36, n.2, p. 119-122, 1998.

LEIMANN, B. C. Q.; KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. **Cad. Saúde Públ.**, v. 24, n. 11, p. 2582-2592, 2008

LOPES, A. A. *et al.* Quando os microrganismos salvam vidas: seres diminutos a serviço da produção de medicamentos. **Ciên. Hoje**, v. 286, p. 30-35, 2011.

MAHESHWARI, D. K. *et al.* **Industrial exploitation of microorganisms**. New Delhi: I.K. International Publishing House. 2010.

MIYAUCHI, M. Y. H. **Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de Araucaria angustifolia**. 2012. 105f. Tese (Doutorado) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

PASSONI, L. F. C. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.16, p. 77-81, 1999.

REVANKAR, S. G. **Visão geral das infecções fúngicas**. Manual MSD - Versão para Profissionais de Saúde. 2017. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doencas-infecciosas/fungos>. Acesso em: 1 maio 2019.

SILVA, V. M. **Atividade antagonica de Actinobactérias contra Botrytis sp.** 2014. 37f. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SINGH, S. B. *et al.* Discovery of lucensimycins A and B from *Streptomyces lucensis* MA7349 using anantisens strategy. **Org. Lett.**, v. 8, n. 24, p. 5449-5452, 2006.

SINGH, S.B. *et al.* Discovery and antibacterial activity of lucensimycin C from *Streptomyces lucensis*.

Tetrahedron Lett., v. 49, n. 16, p. 2616-2619, 2008.

WANG, J. *et al.* Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 358-361, 2006.

WANG, J. *et al.* Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 104, n. 18, p. 7612-7616, 2007.

WEI, S.J. *et al.* Studies on the isolation, identification and active tyofanti-Fusarium oxysporum secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. 702. **Acta Agric. Univer. Jiangxi**, v. 33, n. 5, p. 982-986, 2011.

WU, X. *et al.* A novel antibiotic produced by *Streptomyces noursei* Da07210. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 1, p. 109-112, 2009.

1 Acadêmica do curso de Farmácia, Universidade Ceuma.
E- mail: suellem_8@hotmail.com

2 Acadêmica do curso de Farmácia, Universidade Ceuma.
E- mail: anaceliar2016@hotmail.com

3 Acadêmico do curso de biomedicina, Universidade Ceuma. E-mail: luizalfredo.torressales@gmail.com

4 Nutricionista colaboradora.
E-mail: camilasilva.alves@gmail.com

5 Professora da Universidade Ceuma.
E-mail: rita.miranda@ceuma.br

6 Professor da Universidade Ceuma.
E-mail: luiscn.silva@ceuma.br

7 Professor da Universidade Ceuma.
E-mail: Matheus.alves@ceuma.br

Recebido em: 30 de Março de 2018

Avaliado em: 5 de Maio de 2018

Aceito em: 10 de Agosto de 2018



A autenticidade desse artigo pode ser conferida no site <https://periodicos.set.edu.br>



Este artigo é licenciado na modalidade acesso abertosob a Atribuição-Compartilhaigual CC BY-SA



Antimicrobial Potential of *Streptomyces ansochromogenes* (PB₃) Isolated From a Plant Native to the Amazon Against *Pseudomonas aeruginosa*

OPEN ACCESS

Edited by:

Natalia V. Kirienko,
Rice University, United States

Reviewed by:

Koshy Philip,
University of Malaya, Malaysia
Devendra Dusane,
The Ohio State University,
United States

*Correspondence:

Rita de Cássia Mendonça de
Miranda
rita.miranda@ceuma.br;
ritamend30@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 20 June 2020

Accepted: 09 September 2020

Published: 09 October 2020

Citation:

Amorim EAdF, Castro EJM,
Souza VdS, Alves MS, Dias LRL,
Melo MHF, da Silva IMA, Villis PCM,
Bonfim MRQ, Falcai A, Silva MRC,
Monteiro-Neto V, Aliança A, da
Silva LCN and de Miranda RdCM
(2020) Antimicrobial Potential
of *Streptomyces ansochromogenes*
(PB₃) Isolated From a Plant Native
to the Amazon Against *Pseudomonas*
aeruginosa.
Front. Microbiol. 11:574693.
doi: 10.3389/fmicb.2020.574693

Erika Alves da Fonseca Amorim¹, Erima Joussielly Mendonça Castro¹,
Viviane da Silva Souza², Mateus Silva Alves¹, Léo Ruben Lopes Dias¹,
Maycon Henrique Franzoi Melo¹, Ilana Mirian Almeida da Silva¹,
Paulo Cesar Mendes Villis¹, Maria Rosa Quaresma Bonfim¹, Angela Falcai¹,
Maria Raimunda Chagas Silva¹, Valério Monteiro-Neto^{1,2}, Amanda Aliança¹,
Luís Cláudio Nascimento da Silva¹ and Rita de Cássia Mendonça de Miranda^{1*}

¹ Programa de Pós Graduação, Universidade CEUMA, São Luís, Brazil, ² Programa de Pós Graduação, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brazil

The objective of this study was to evaluate the antibacterial action of filamentous bacteria isolated from the *Byrsonima crassifolia* leaf. An endophytic bacterium has been identified by classical and molecular techniques as *Streptomyces ansochromogene*. Screening for antibacterial action against pathogens with medical relevance (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27012, *Mycobacterium abscessus*, *Cryptococcus gattii* ATCC 24065, and *Cryptococcus neoformans* ATCC 24067) demonstrated activity against the bacterium *P. aeruginosa* ATCC 0030 with inhibition diameter zones (IDZ) of 17.6 ± 0.25 mm in the preliminary screening in solid medium. After fermentation in liquid medium, an IDZ of 19.6 ± 0.46 mm and a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.5 mg/mL were detected. The antibiofilm action was observed with 100% inhibition of biofilm formation at a concentration of 0.250 mg/mL. When the infection curve was prepared, it was observed that the metabolite was effective in protecting the larvae of *Tenebrio molitor*. The metabolite does not show toxicity for eukaryotic cells. The leishmanicidal activity demonstrated that the metabolite presented a dose-dependent effect on the promastigotes forms of *Leishmania amazonensis* growth and the estimated IC₅₀/72 h was 71.65 ± 7.4 μg/mL. Therefore, it can be concluded that the metabolite produced by the endophytic bacterium *Streptomyces* sp. is promising for future use as an alternative strategy against bacterial resistance.

Keywords: endophytes, biotechnological potential, actinomycetes, metabolites, endophytic, resistance

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance is a dangerous and constantly increasing problem, leading to an increase in health care costs, decreased treatment options, and a higher incidence of mortality due to bacterial and fungal infections worldwide. Global initiatives are calling for urgent action not only to develop new antimicrobial therapies but also decrease the contribution of humans to increasing antimicrobial resistance (World Health Organization, 2015).

The excessive and inappropriate use of antibiotics continues to be a major factor in the expansion of antimicrobial resistance, and the search for new drugs has been an alternative to minimize the damage caused by this phenomenon.

Among the resistant microorganisms, a bacterium of most concern is *Pseudomonas aeruginosa*. According to Pang et al. (2019), *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen and a major cause of morbidity and mortality in patients with cystic fibrosis and immunocompromised individuals. The authors emphasize that the eradication of *P. aeruginosa* has become increasingly difficult due to its remarkable ability to resist antibiotics by intrinsic and acquired methods. The exchange of genetic material, which occurs naturally within or between species Gram-negative bacilli, is considered to be a factor responsible for the acquisition of resistance. Thus, the ability of *P. aeruginosa* to become resistant during antibiotic treatment is inherent to the species and is often inevitable (Lincopan and Trabulsi, 2008). In intensive care units (ICUs) in Brazilian hospitals, antibiotic resistance is very worrying.

National epidemiological studies carried out, aimed at hospitalized patients, evaluated 3,728 isolates, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, obtained from 12 hospital centers in four states, and *P. aeruginosa* was responsible for 496 (13.3%) cases and the third most frequent pathogen, with 30.2% resistance to Integrated Pest Management (IPM) (Sader et al., 2001; Pang et al., 2019).

It is necessary to search for alternatives for treating diseases caused by these resistant microorganisms. Brazil is the country with the greatest biodiversity on the planet (Laihonon et al., 2004), and the Amazon ecosystem is one of the richest and most important because of its plant diversity that can house compounds with antimicrobial action.

The use of plants as a medicine is a practice adopted by traditional people; however, large-scale production of medicines is difficult. Therefore, the use of microorganisms that live inside the plant (endophytic) can be an alternative for the production of biologically active compounds through biotechnological techniques (Jiang et al., 2013; Hussain et al., 2015; Rajamani et al., 2018).

Among the microorganisms that produce bioactive compounds, those of the *Actinomycetales* family stand out, especially *Streptomyces* spp., which is known for its ability to produce substances with several antimicrobial, antimalarial, and antitumor actions (Supong et al., 2016; Elkhayat and Goda, 2017; Bunbamrung et al., 2020; Mahmood and Kataoka, 2020).

Considering these facts, this work aims to assess the antimicrobial potential of *Streptomyces ansochromogene*,

isolated from *Byrsonima crassifolia* leaf, against pathogens of clinical interest.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

The microorganism used in this work is an endophytic bacterium previously isolated from *Byrsonima crassifolia* leaf, a plant native to the region of the Legal Amazon (Brazil). The bacterium is deposited in the culture bank of Ceuma University under the code PB₃.

To test the antimicrobial potential of the isolated bacteria, the following microorganisms were used: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 15692, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27012, *Mycobacterium abscessus massiliense*Go01, *Cryptococcus gattii* ATCC 24065, and *Cryptococcus neoformans* ATCC 24067.

To assess the Leishmanicidal potential, *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/76/MA-76) was used.

Identification of the Microorganism

Classical Identification

For classic identification of the isolate, the microculture technique was performed. Previously isolated and purified microorganism was inoculated in a Petri dish containing the BDA medium that favors radial growth. A coverslip was partially inserted into the medium to facilitate the growth of hyphae on its surface. This was incubated in an oven at 28°C for 5 days (Shirling and Gottlieb, 1966; Matsuura, 2004). Structures such as conidiospores, hyphae, spore chains, and conidia were stained with cotton blue and observed under an optical microscope with 100x magnification lenses. Genera level identification was possible by observation of macroscopic characteristics and microscopic morphological structures. For the morphological description of the genera, the criteria adopted by Rapper and Fennell, 1965, Pitt, 1979, Pitt and Samson, 1990 and Klich and Pitt, 1988.

Molecular Identification: DNA Extraction, Amplification of the 16sR Region, and Sequencing

Molecular identification was used to confirm the bacterial species previously identified by classical techniques. Thus, the bacteria were grown in Petri dishes for five days and incubated in PBS for 2 h at 27°C. After centrifugation at 7500 rpm for 10 min, supernatant was discarded and pellet was suspended in 180 µL of lysozyme (200 µg/mL), incubated for 30 min at 37°C. To this solution, 20 µL of proteinase K and another 200 µL of Buffer AL buffer solution (QIAmp) were added. The solution was homogenized and incubated for 30 min at 56°C, then for another 15 min at 95°C. The material was centrifuged and 200 µL of absolute ethanol was added and centrifuged again. The samples were transferred to the Purification Kit (QIAmp DNA mini kit) and centrifuged for 1 min at 8000 rpm. The filtrate was discarded, and 500 µL of AW2 buffer solution (QIAmp) was added and centrifuged for 3 min at 1400 rpm. The filtrate was discarded again and centrifuged for 1 min at 1400 rpm, and then 50 µL

of Buffer AE buffer solution (QIAmp) was added and incubated for 1 min and centrifuged again for 1 min at 8000 rpm. This last step was repeated (1X). A small amount of the target DNA was added to a PCR buffer solution (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM KCl) containing DNA polymerase, universal primers P27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'), and P1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lee et al., 2007). In PCR tubes, 0.25 mL of the mixture was placed, which was subjected to approximately 40 replication cycles *in vitro* (Thermociclador) for 1 min at 95°C, 45 s at 57°C, and 30 s at 72°C. DNA was quantified using NanoDrop® ND-1000 UV-Vis. The samples were applied to an agarose gel immersed in a TBE buffer solution and electrophoresis was performed for 40 min. The gel was stained with UniSafedye (0.1 µL/mL) for 40 min, protected from light and read on an ultraviolet light transilluminator. The PCR product was sequenced and analyzed using MegaSoftware® and Blast (NCBI). The sequence of the 16S rRNA gene obtained by PCR was analyzed and manually aligned with strains of the genus found in the GenBank/NCBI database with Clustal-X. The phylogenetic tree was built using MEGA version 7.0. The sequence was submitted to GENBANK/PUBMED and deposited under code MT634691.

Preliminary Antimicrobial Screening

Solid Media Assay

Antimicrobial activity testing was performed on solid medium through the diffusion of the bioactive compound in agar using the method described by Ichikawa et al. (1971). This method is also known as the Gelose Block Method using the isolated endophytic microorganism. After ten days of incubation at 28°C, circular agar blocks of 6 mm in diameter were removed from the plates with colonies grown by clogging and transferred to the plates containing MH, previously seeded with the standard microorganisms at 5×10^5 UFC/mL. This test was performed in triplicates. After 24 h at a temperature of 37°C, the diameters (mm) of the inhibition halos of each block were measured, analyzing the longest distance between 2 rectilinear points that cross the block of glucose in half. A Matsuura scale (2004) was used to classify the results, so that the arithmetic mean and standard deviation of the results were obtained. The results were expressed as mean inhibition diameter zones (IDZ) in millimeters (mm).

Antimicrobial Activity

Submerged Fermentation

To obtain the active metabolite produced by the isolated microorganism, submerged fermentation was carried out in Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 50 mL of useful volume of potato dextrose (PD) medium. The flasks were incubated in a rotary incubator at 30°C for 5 days. After this period, the sample was filtered to assess biological activities.

Secondary metabolites extraction

To obtain the metabolite(s) of interest, liquid-liquid extraction was performed according to the methodology described by Trisuwana et al. (2008). Therefore, after the incubation period, the fermented culture was filtered through a vacuum filter, and

the free extract of microbial cells was separated. The fermented filtrate was subjected to centrifugation and filtered again in a 22 µm filter, ensuring that the extract did not contain microbial cells.

To extract the compounds of interest, 25 mL of the filtrate and 25 mL of ethyl acetate were added to a separating funnel, shaken vigorously for 10 min, and placed at rest for 30 min. After the mentioned time, the organic phase containing the analytes of interest was collected. The solvent was then evaporated on a rotary evaporator, and the product yield was determined.

For the evaluation of biological activities, the extract was resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) to reach a known concentration of 1 mg/mL.

Agar diffusion assay

The liquid medium assay was performed using the plate diffusion test (Bauer et al., 1966) to determine whether the microorganisms selected in the previous assay secrete metabolites to the external environment. The plate diffusion test was established as a standard by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and consists of the application of 10 µL of the metabolite produced in 6 mm diameter wells, made in petri dishes with 20 mL of Mueller Hinton agar medium, seeded with gram-negative bacteria, incubated at 37°C for up to 72 h. After this period, IDZs were measured with the aid of a caliper. In the 6 mm wells, 10 µL of DMSO and 10 µL of chloramphenicol (30 µg) were used as negative and positive controls, respectively.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration

For the determination of the minimum concentration capable of inhibiting bacterial growth, the microdilution test was performed, using a 96-well 6-mm multi-well plate, the metabolite was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO). The calculation to determine the concentration followed the CLSI protocol, which recommends 1000 µg/mL.

The technique described by Zgoda and Porter (2001) was adapted. Mueller Hinton broth (190 µL) and the metabolite (10 µL) diluted in DMSO at an initial concentration of 1000 µg/mL were dispensed in the first row of wells. In the other wells, 100 µL of medium Muller Hinton broth was added. A serial dilution was then performed in the nine consecutive wells, removing 100 µL from the well of the highest concentration, resulting in dilutions from 1000 µg/mL to 0.0625 µg/mL. In the penultimate well, the inoculum and extract were not added to have a negative control. In the last well, medium and inoculum were added as positive control. Microbial growth was determined by bacterial colony growth. The concentration of the bacterial suspension was determined according to the McFarland scale 5×10^5 CFU/mL. The plate was incubated at 37°C for 24–48 h.

Evaluation of Antibiofilm Activity

The inhibitory capacity of the metabolite in biofilm formation was assessed according to the method recommended by Stepanović et al. (2007). The method consists of adding 100 µL of Broth Muller Hinton medium to all 96 wells of a multi-well plate. The first and last rows are the negative and positive controls, respectively. In the second row, another 50 µL of culture

medium was added, totaling 150 μL of medium. Then, 50 μL of the metabolite in sub-MICs was added to this second row, totaling a volume of 200 μL in the second row. Serial dilution was performed up to the penultimate row before the positive control. After diluting 100 μL of the inoculum on a 0.3×10^8 scale, all wells were added, except for the negative control. The plate was incubated at 37°C for 24 h. After this period, the contents of the plate were removed, and the wells were washed with PBS buffer or saline solution. To fix the biofilm, 200 μL of methanol was placed in the wells for 15 min at room temperature. This was washed with PBS or saline again. The wells were stained with crystal violet and incubated for 15 min at 37°C . They were then washed in running water to remove excess dye. After drying, 250 μL of ethanol was used for suspension in the wells, and ethanol was transferred to a new plate that was taken to read the optical density in a 550 nm microplate reader. To determine the cell viability of bacterial biomass, the test was repeated and the crystal violet was replaced by resazurin indicator.

Action of Metabolite on Biofilm

Eradicating the action of preformed biofilm was assessed using the method of Klein et al. (2015), with modifications. It was divided into two stages: 1. For the previous formation of the biofilm and 2. Evaluating the eradication of the formed biofilm. The first step consisted of the formation of the biofilm in a 96-well plate, where 100 μL of Muller Hinton broth culture medium was added to all wells, and the first and last rows were the negative and positive controls, respectively. Then, 100 μL of the standardized microbial inoculum was added to 0.3×10^8 cells, except in the first row, which was the negative control. This plate was incubated at 37°C for 24 h. Later, the second stage began, where the contents of the plate were removed, and the wells were washed with PBS buffer or saline solution. Then, 100 μL of Muller Hinton broth medium was added to the washed wells. In the second row of the wells, the metabolite was placed in supra-MIC ($4 \times \text{MIC}$), followed by serial dilution. This plate was incubated again for 24 h at 37°C .

After this step, the contents of the wells were gently removed and washed with PBS buffer. Then, 200 μL of methanol was placed for 15 min at room temperature. The wells were again washed with PBS buffer, stained with crystal violet, and incubated at 37°C for 15 min. After that, the plate was washed under running water, and after drying, the wells received 250 μL of ethanol. This suspension was transferred to a new plate and was taken to read optical density in an Elisa reader at 550nm.

Infection and Survival Curve in an Alternative Model

To standardize the inoculum concentration scale in its pathogenic potential of *P. aeruginosa*, 5 standardized solutions were prepared of 0.1, 0.2, 0.3, 0.3 and 0.5×10^8 cells using Newbauer Chamber. Each concentration was inoculated into 10 larvae of *T. molitor* to observe mortality levels. The smallest scale that obtained the ability to kill *T. molitor*, in less days of observation, was the inoculum scale used for infection and survival curves (Figure 4A). Having the inoculum scale defined

previously, four groups composed of 10 *T. molitor* each were established. Of these, three groups were infected with the pathogen, after 2 h of infection, one group was treated with 10 μL of the test extract, another group received no treatment, and the fourth group was not infected, for quality control of *T. molitor*. They were observed for 10 days, where the survival time was observed.

Leishmanicidal Activity Against Promastigotes

To determine the IC₅₀ (a concentration that inhibits 50% of parasite growth) value, promastigote forms of *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/76/MA-76) were incubated in the presence of increasing concentrations of the secondary metabolite (7.8–500 $\mu\text{g/mL}$). The cells were diluted at a concentration of 1×10^6 parasites/mL. As a control, cells incubated with Schneider's medium were used. After 72 h of incubation the surviving parasites were counted in a Neubauer chamber (INCYTO CChip DHC-N01, Cheonan-Si, South Korea). The IC₅₀ value was determined by linear regression analysis using SPSS 8.0 software (IBM Co., New York, United States) for Windows. Each experiment was performed in biological duplicate and technical triplicate.

Cytotoxicity Assay

The MTT method is based on the determination of the ability of living cells to reduce 3-(4,5 Dimethyl Thiazol-2-IL)-2,5-Diphenyl Tetrazolium (MTT) bromide forming insoluble crystals of formazan violet. After treatment, the culture medium was removed and a 10% solution of MTT (5mg/mL) in PBS was added to each well. Then, the cultures were incubated at 37°C for 3 hours, protected from light. For solubilization of formazan crystals, 100 μL of dimethylsulfoxide (DMSO) was added to each well and the presence of violet formazan crystals was observed. The spectrophotometric reading of the absorbance was performed in an ELISA plate reader (Bio-Rad Microplate Reader Benchmark, Inc., United States) at a wavelength of 550 nm. The percentage of dead cells was calculated in relation to the positive toxicity control.

RESULTS

Microorganism Identification Classical Identification

The classical identification of microorganism was carried out through macro and microscopic observation of the colonies. Features such as colony color, pigment production in the culture medium, and microscopic structures were considered. Macroscopic observation of the colony in a Petri dish showed a grayish colony, with predominant aerial mycelium and dark pigment release (Figure 1A). On microscopic observation, it was possible to identify the gray spore chain structures, branched mycelia similar to filamentous fungus hyphae, characteristics compatible with actinobacteria of the genus *Streptomyces* (Figure 1B) (Olmos et al., 2013; Raju et al., 2014). Spores

similar to those of fungi, known as astropores and spiral-shaped sporophores, were also observed (Walkman & Henrici, 1943; Ensign, 1978).

Molecular Identification by PCR

Molecular identification demonstrated a 97.11% genetic similarity with *Streptomyces ansochromogene*. Then, macroscopic identification of the strain genus was confirmed. The evolutionary analysis was performed in MEGA X. A total of 1510 positions were present in the final dataset, involving 7 nucleotide sequences, and the codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + uncoded. Evolutionary history took place using the maximum likelihood method and the Tamura and Nei (1993). The tree for heuristic research was automatically generated by Join-Join, BioNJ, and

distance matrix in estimated pairs using the maximum likelihood approach, selecting the topology most likely to log (2471.39) (**Figure 2**).

Screening of Antimicrobial Potential of Isolated Bacteria

The antimicrobial potential of the *S. ansochromogene* was evaluated using a solid test against seven microorganisms of clinical interest. *S. ansochromogene* was shown to be active for all microorganisms tested, except for *Cryptococcus neoformans* ATCC 24067 (**Table 1**). The higher activities were observed for *M. abscessus*, *C. diphtheriae* ATCC 27012, and *K. pneumoniae* ATCC 700603 with IDZs of 39.3 ± 0.11 mm, 38.3 ± 0.28 mm, and 30 ± 0 mm, respectively. In this test, the bacterium was also

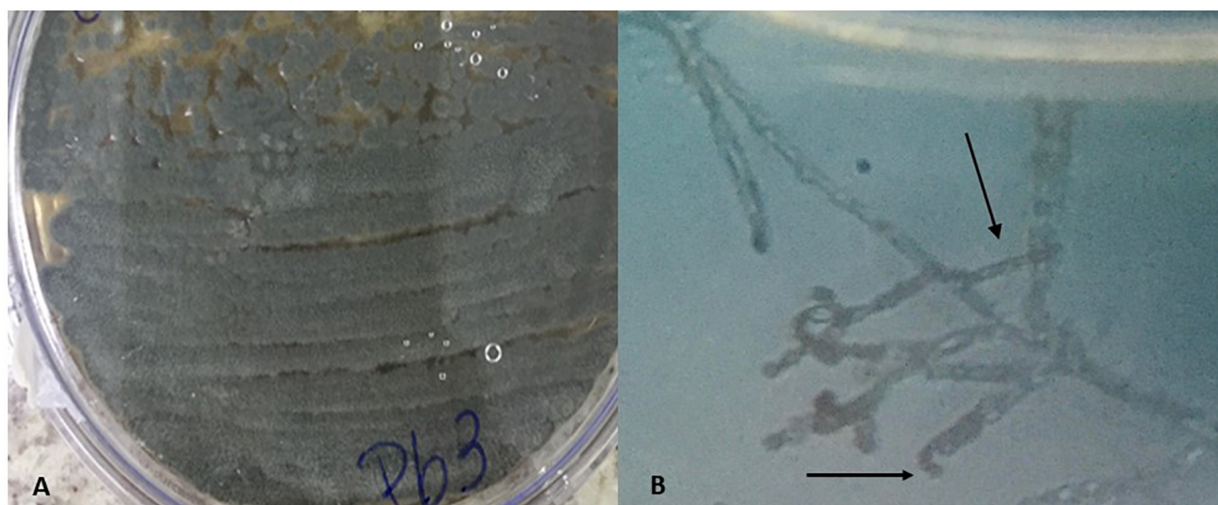


FIGURE 1 | Macroscopic characteristic with aerial mycelium of grayish color showing the production of pigment **(A)** and microscopic with spiral-shaped sporophores characteristic of bacteria of the genus *Streptomyces* **(B)**.



FIGURE 2 | Phylogenetic tree likelihood, based on the sequences of the 16S rRNA gene relating eight strains of bacteria of the genus *Streptomyces*. Branch nodes have an initialization value based on 1000 resampled datasets.

TABLE 1 | Diameters of inhibitions zones formed by *Streptomyces ansochromogene* against the pathogens tested in medium solid assays.

Microorganisms pathogens	PB3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	30 ± 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15692)	17.6 ± 0.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	14.3 ± 0.11
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (27012)	38.3 ± 0.28
<i>Mycobacterium abscessus</i> (IC)	39.3 ± 0.11
<i>Cryptococcus neoformans</i> (24067)	0
<i>Cryptococcus gattii</i> (24065)	26 ± 0.1

active against the pathogenic yeast *C. gattii* 24065 and the bacteria *P. aeruginosa* ATCC 15692 and *S. aureus* ATCC 6538 with IDZs of 26 ± 0.1 , 14.3 ± 0.11 , and 17.6 ± 0.25 , respectively.

Agar Diffusion Assay

To investigate whether *S. ansochromogene* PB3 secreted the active metabolite (s), a liquid test was performed followed by liquid-liquid extraction with ethyl acetate. The crude extract was obtained with a yield of 0.16 g/L and tested against *K. pneumoniae* (ATCC 700603); *P. aeruginosa* (ATCC 15692); *C. diphtheriae* (ATCC 27012); *M. abscessus* and *C. gattii* (ATCC 24065). Showing inhibitory activity against *P. aeruginosa* ATCC 15692 (IDZ 19.6 ± 0.47 mm) (Table 2).

Determination of Minimum Inhibitory Concentration

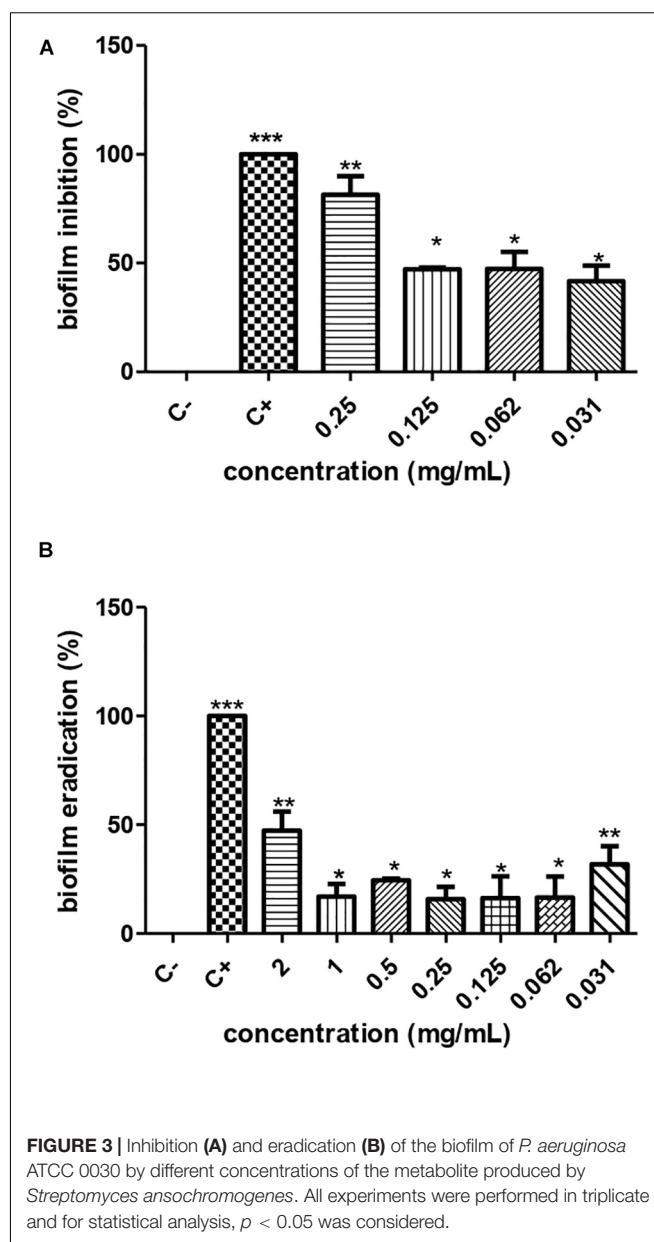
To evaluate the lowest concentration that inhibited the growth of *P. aeruginosa* (ATCC 15692) determined in the previous test, the minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated according to the CLSI protocol. The end point of the MIC was considered to be its lowest concentration, where there was no color change. All tests were performed in triplicates. The minimum inhibitory concentration was 0.5 mg/mL for the extracted metabolite.

Anti-biofilm Activity

According to the crystal violet technique, the metabolite produced by *S. ansochromogene* PB3 inhibited the biofilm formed by *P. aeruginosa*, at sub-MICs of 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.0625 mg/mL, and 0.0312 mg/mL, eradicating 82.54%, 46.53%, 33.44%, and 27.98%, respectively. This presented antimicrobial activity on *P. aeruginosa* biomass (ATCC 15692). The cellular

TABLE 2 | Diameters of inhibitions zones formed by *Streptomyces ansochromogene* against the pathogens tested in medium liquid assays.

Microorganisms pathogens	PB3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15692)	19.6 ± 0.47
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	0
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (ATCC 27012)	0
<i>Mycobacterium abscessus</i> (IC)	0
<i>Cryptococcus gattii</i> (ATCC 24065)	0



infeasibility of biomass in the first inhibitory concentrations was confirmed by a test with resazurin (Figure 3A).

Action of Metabolite on Biofilm

The metabolite produced by *S. ansochromogene* PB3 reduced 50% of the biofilm formed, at a hyperinhibitory concentration of 2 mg/ml (Figure 3B). The resazurin test confirmed the cellular infeasibility of the biofilm bacterial biomass at this concentration.

Infection and Survival Curves in an Alternative Model

The metabolite produced by the strain of *S. ansochromogene* at a concentration of 1 mg/L showed the ability to increase the life span of *T. molitor* infected with the pathogen *P. aeruginosa*.

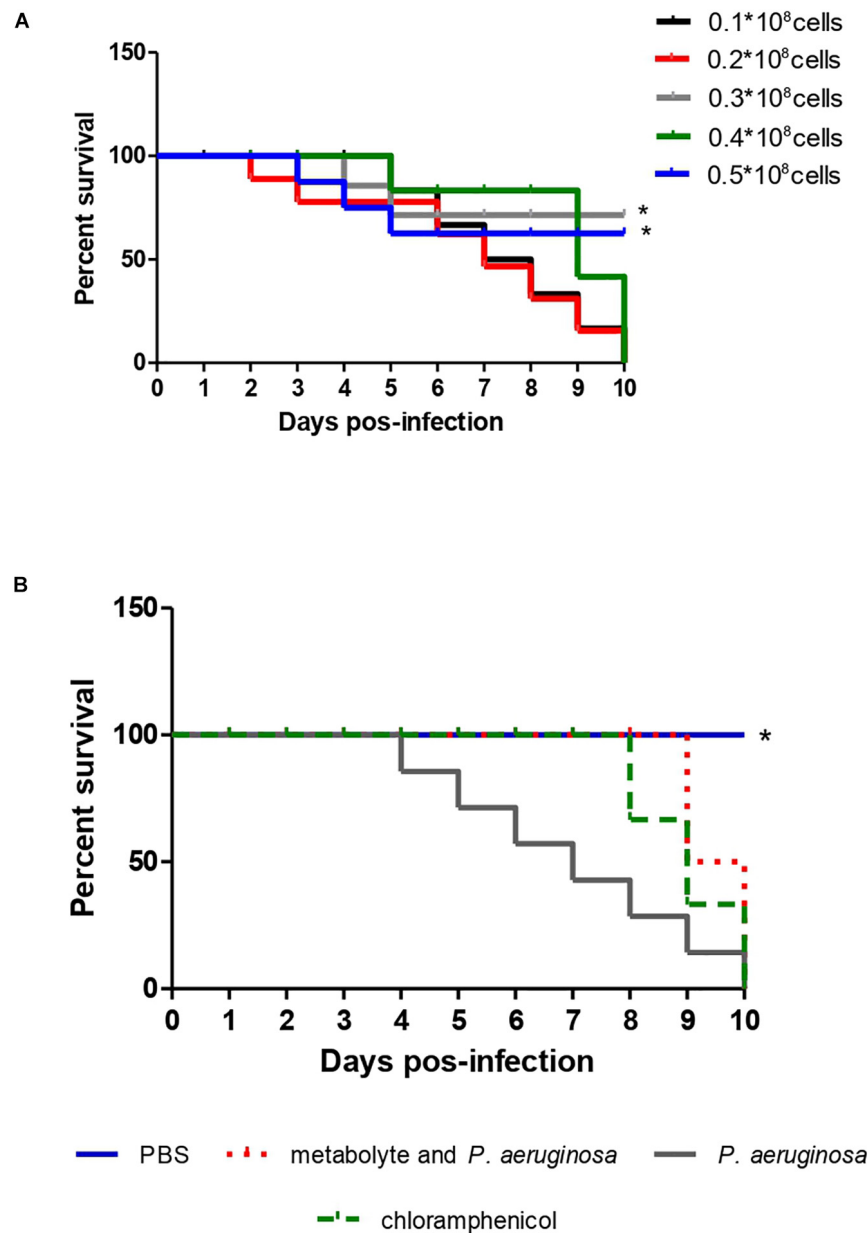


FIGURE 4 | Survival curve of 10 *T. molitor* larvae infected with different concentrations of *P. aeruginosa* cells ATCC 0030 for standardization of the inoculum **(A)** and for treatment with metabolite produced by *Streptomyces ansochromogenes* **(B)**. All experiments were carried out in triplicate for statistical analysis, $p < 0.05$ was considered.

The larvae infected with a standard solution of 0.3×10^8 of *P. aeruginosa* were all dead on the eighth day but those infected with the bacterium and inoculated with the metabolite survived until the eighth day; two larvae died on the ninth and tenth days, a behavior similar to the larvae infected with *P. aeruginosa* and treated with chloramphenicol (**Figure 4B**). When the statistical analysis was performed, a significant difference was observed between the treatment of the larva with the metabolite in relation to the larva infected with *P. aeruginosa* ($p = 0.0082$); however,

there was no difference when comparing the treatment of the larva with the metabolite and chloramphenicol.

Leishmanicidal Activity Against Promastigotes

The results demonstrated that the metabolite presented a dose-dependent effect on the promastigotes forms of *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/MA-76) growth; it is possible to observe that in

the five highest concentrations the metabolite was able to reach more than 50% growth inhibition (Figure 5A). The estimated $IC_{50}/72\text{ h}$ was $71.65 \pm 7.4\text{ }\mu\text{g/mL}$.

Cytotoxicity Assay

The toxicity test was carried out to assess the potential of the metabolite to cause damage to cells of eukaryotic organisms. The result of the cytotoxicity test showed that the metabolite produced by the bacterium *S. ansochromogene* is not toxic to the cell at any concentration tested (Figure 5B).

DISCUSSION

The bacterium used in this work was isolated from a leaf of *Byrsonima crassifolia* and was shown to be promising against *P. aeruginosa*. Endophytic microorganisms have been

increasingly studied owing to their potential as excellent agents with diverse biological activities (Gos et al., 2017; Pinheiro et al., 2017; Rajamani et al., 2018; Singh et al., 2018). To identify the isolated bacterium, classical and molecular identification was performed, obtaining the bacterium *S. ansochromogene*. Molecular identification was used as the main tool for identifying these bacteria because in many cases, they can be confused with fungi. Van Nguyen et al. (2019) reported the genome sequence of an endophytic *Streptomyces* sp. that produced a bioactive compound of clinical interest. Bacteria of the genus *Streptomyces* are known to produce bioactive compounds with diverse biological activities. Its morphology and high metabolic potential favor the permanence of the bacteria inside the plant where there is a symbiotic relationship between the plant and the microorganism. Several authors have reported the isolation of bacteria of this genus associated with plants used by humans for various purposes. Lei et al. (2016) isolated a *Streptomyces* sp. from a medicinal plant (*Polygonum cuspidatum*) and observed its antimicrobial activity against Gram-negative bacteria *Escherichia coli*. Al-Ansari et al. (2019) reported the isolation of ten actinomycetes from the soil, of which five demonstrated activity against *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis*. Kalyani et al. (2019) isolated 143 actinomycetes, including a *Streptomyces* sp. NLKPB-45 showed activity against Gram-positive bacteria, *S. aureus*, and Gram-negative *Escherichia coli* and *P. aeruginosa*.

In this study, the bacterium isolated from the leaf of *Byrsonima crassifolia* was identified as *S. ansochromogene* and showed activity against several pathogens of clinical interest, including the Gram-negative bacterium *P. aeruginosa*. This makes the study of the metabolite produced by the bacteria promising.

The prospecting of compounds with activity against *P. aeruginosa* has been increasingly intensified due to the phenomenon of resistance to antimicrobials that these bacteria have demonstrated. Neves et al. (2011) reported the phenomenon of resistance to antimicrobials by this bacterium as an endemic, affecting an important portion and with strains resistant to the main antibiotics for clinical use. Although the search for active compounds is reported in the literature, there are not many studies showing activity of bacteria of the genus *Streptomyces* sp. against *P. aeruginosa*. Kalyani et al. (2019) reported the activity of *Streptomyces* sp. NLKPB-45 against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *P. aeruginosa*. Ashitha et al. (2019) isolated endophytic bacteria from the Chinese medicinal plant *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp. Among the isolates, the bacterium *Burkholderia* sp. showed activity against several pathogens of clinical interest, including the bacterium *P. aeruginosa* MTCC 2453.

The concentration at which the metabolite shows activity is extremely important to assess its viability. In this work, extraction of the active fraction of the metabolite was performed using ethyl acetate solvent to determine the lowest concentration that showed activity (MIC). Lei et al. (2016) reported the activity of the metabolite acetate fraction produced by *Streptomyces* sp. A09916 against Gram-negative bacteria *Salmonella* sp. S11A235 at a concentration of 0.125 mg/L. Kumar et al. (2020) obtained the active fraction of the metabolite produced by *Streptomyces*

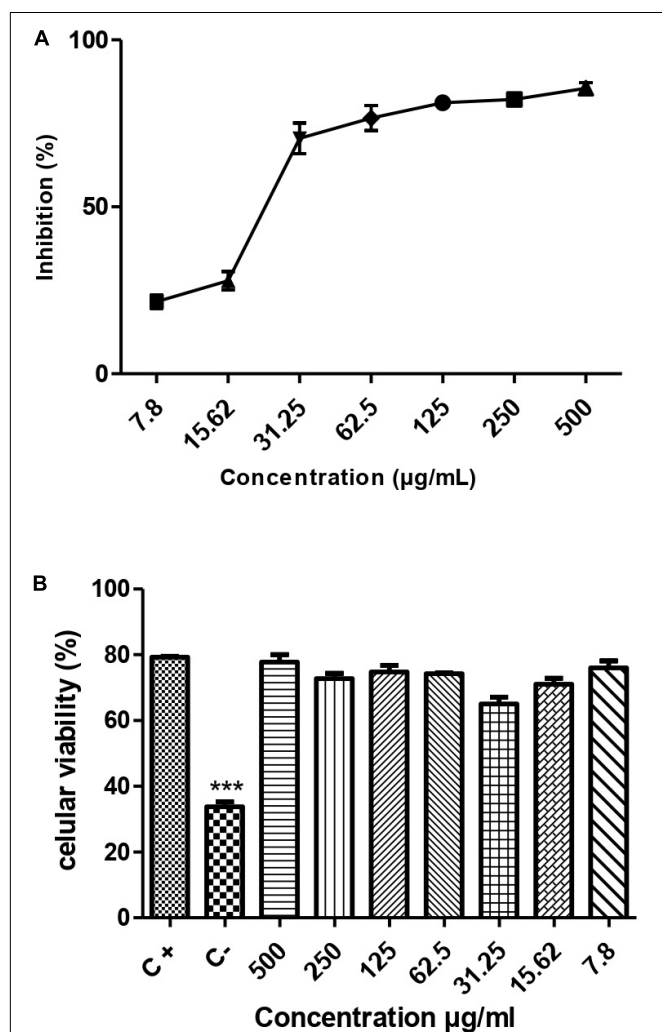


FIGURE 5 | Leishmanicidal activity (A) and cytotoxicity (B) of the metabolite produced by the endophytic bacteria *Streptomyces ansochromogenes* (PB3). All experiments were carried out in triplicate for statistical analysis, $p < 0.05$ was considered.

olivaceus LEP 7 with a Minimum Inhibitory Concentration of 50 µg/mL against the bacterium *P. aeruginosa*.

One of the main problems that make infections by the *P. aeruginosa* bacteria even more difficult to treat is that, in addition to the resistance phenomenon, these bacteria also have the ability to form biofilms due to the high capacity to carry out the quorum sense due to the glycidic nature of its cell wall (Satpathy et al., 2016). Given this characteristic, it is important to investigate the ability of the metabolite to prevent formation or eradicate the biofilm. In this study, the acetate fraction extracted from the metabolite of the endophytic bacteria *S. ansochromogene* showed the ability to inhibit and eradicate biofilms formed by *P. aeruginosa* at subinhibitory concentrations. The two phenomena (inhibition and eradication of biofilm) are related to the tested concentration of the metabolite, which can be explained by the selectivity of the membrane, which allows the metabolite to penetrate the cell at lower concentrations, making it more efficient. Antibiofilm activity has been investigated and reported by several authors. Æiríæ et al. (2019) reported the importance of the search for metabolites that inhibit the phenomenon of quorum sense, the first step in the formation of biofilms. The authors emphasize that many plants already have this known activity; however, the search for metabolites produced by microorganisms with this activity should be intensified. Younis et al. (2016) reported the metabolite antibiofilm activity produced by a species of *Streptomyces* sp. isolated from a marine environment. The authors emphasized the ability of the metabolite acetate fraction to inhibit the phenomenon of quorum sense, thus preventing the formation of biofilm. Pattnaik et al. (2018) reported the antibiofilm activity of the extract of the metabolite produced by the fungus *Diaporthe phaseolorum* SSP12 against a biofilm formed by *P. aeruginosa* PAO1. The authors also emphasized the ability of the extract to inhibit $79\% \pm 3.5\%$ quorum sensing formation in concentrations of 0.750 µg/mL, which is commonly performed by strains of these bacteria. The use of compounds with anti-biofilm activity has been reported as a possible alternative therapy for treating various infections as a solution to the phenomenon of microbial resistance (Santhakumari and Ravi, 2019).

Biofilm formation is a strategy used by *P. aeruginosa* to cause infections, so it is important to test the metabolite activity *in vivo*. In this study, the capacity of the *S. ansochromogene* metabolite was tested in an alternative model using *T. molitor* larvae. In this evaluation, it was observed that the metabolite at the concentration (0.5 mg/mL) established in the MIC had the capacity to inhibit the infection caused by *P. aeruginosa* bacteria in *T. molitor*. The larvae treated with the metabolite showed greater survival than those treated with the antibiotic chloramphenicol, emphasizing the protective effect of the metabolite. Because the use of animal models is decreasing for ethical reasons, alternative models have been reported in the literature as an excellent way to evaluate the effectiveness of compounds in living beings. Silva et al. (2019) assessed the ability of *S. aureus* to infect *Galleria mellonella* larvae. The authors observed the pathogen's ability to infect and form biofilms inside the animal.

Leishmaniasis is a treatable and curable disease, but drugs that used in treatment have several limitations because of serious side effect (World Health Organization (WHO), 2018; Araújo et al., 2019). The results showed that the secondary metabolite inhibited the growth of promastigote forms, a fact observed by Santiago et al. (2012) that isolated 564 endophytic fungi from plants of the Antarctic, these 19 sources leishmanicidal activity against a promastigote form of *L. amazonensis*. This activity is reinforced by the cytotoxicity test that shows that the metabolite is not toxic to the cell at any concentration tested, suggesting its specificity for the protozoan.

CONCLUSION

The endophytic bacterium *S. ansochromogene* has anti-microbial potential because it produces a metabolite that can be used for its antimicrobial and antibiofilm action against the bacterium *P. aeruginosa* and against *L. amazonensis* in promastigote form. In view of these results, studies will be carried out with the objective of identifying the compound and expanding its spectrum of action, evaluating whether it has activity against other protozoa and tumors.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, MT634691.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

This manuscript has as main objective to show the action of one or more compounds produced by a microorganism called *Streptomyces ansochromogenes* isolated from a plant in face of a common actia in contaminated wounds called *Pseudomonas aeruginosa*. This bacterium has the ability to form biofilms to be able to colonize contaminated wounds when an infection process begins, so it is important that compounds manage to prevent this mechanism. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Maranhão—FAPEMA (ECT-05756/18).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Universidade Ceuma for supporting research.

REFERENCES

- Al-Ansari, M., Alkubaisi, N., Vijayaragavan, P., and Murugan, K. (2019). Antimicrobial potential of *Streptomyces* sp. to the Gram positive and Gram negative pathogens. *J. Infect. Public Health* 12, 861–866. doi: 10.1016/j.jiph.2019.05.016
- Araújo, I. A. C., de Paulo, R. C., Alves, C. L., Faria, K. F., de Oliveira, M. M., Mendes, G. G., et al. (2019). Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 199, 67–73. doi: 10.1016/j.exppara.2019.02.013
- Ashitha, A., Midhun, S. J., Sunil, M. A., Nithin, T. U., Radhakrishnan, E. K., et al. (2019). Bacterial endophytes from *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp., with antibacterial efficacy against human pathogens. *Microb. Pathog.* 135:103624. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103624
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493–496. doi: 10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- Bunbamrung, N., Intaraudom, C., Dramaee, A., Thawai, C., Tadtong, S., Auncharoen, P., et al. (2020). Antibacterial, antitubercular, antimalarial and cytotoxic substances from the endophytic *Streptomyces* sp. *Phytochemistry* 172:112275. doi: 10.1016/j.phytochem.2020.112275
- Eiríe, A. D., Petrović, J. D., Glamočlija, J. M., Smiljković, M. S., Nikolić, M. M., Stojković, D. S., et al. (2019). Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: a comprehensive review update and future trends. *S. Afr. J. Bot.* 120, 65–80. doi: 10.1016/j.sajb.2018.09.010
- Elkhayat, E. S., and Goda, A. M. (2017). Antifungal and cytotoxic constituents from the endophytic fungus *Penicillium* sp. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* 55, 85–89. doi: 10.1016/j.bfopcu.2017.03.001
- Ensign, J. C. (1978). Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 185–219. doi: 10.1146/annurev.mi.32.100178.001153
- Gos, F. M. W. R., Savi, D. C., Shaaban, K. A., Thorson, J. S., Aluizio, R., Possiede, Y. M., et al. (2017). Antibacterial activity of endophytic actinomycetes isolated from the medicinal plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). *Front. Microbiol.* 8:1642. doi: 10.3389/fmicb.2017.01642
- Hussain, H., John, M., Al-Harrasi, A., Shah, A., Hassan, Z., Abbas, G., et al. (2015). Phytochemical investigation and antimicrobial activity of an endophytic fungus *Phoma* sp. *J. King Saud Univ. Sci.* 27, 92–95.
- Ichikawa, T., Date, M., Ishikura, T., and Ozaki, A. (1971). Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.* 16, 218–224.
- Jiang, S., Qian, D., Yang, N., Tao, J., and Duan, J. (2013). Biodiversity and antimicrobial activity of endophytic fungi in *Angelica sinensis*. *Chin. Herb. Med.* 5, 264–271.
- Kalyani, B. S., Krishna, P. S., and Sreenivasulu, K. (2019). Screening and identification of novel isolate *Streptomyces* sp. NLKPB45 from Nellore coastal region for its biomedical applications. *Saudi J. Biol. Sci.* 26, 1655–1660. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.08.027
- Klein, M. L., Hwang, G., Santos, P. H. S., Campanella, O. H., and Koo, H. (2015). *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5:10. doi: 10.3389/fcimb.2015.00010
- Klich, M. A., and Pitt, J. I. (1988). *Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*. Sydney, NSW: CSIRO, Division of Food Processing.
- Kumar, R. S., Ahmad, P., Keerthana, S. S., Cressida, P. J., Moorthy, I. G., and Raja, S. S. (2020). Extraction and purification of an antimicrobial bioactive element from lichen associated *Streptomyces olivaceus* LEP7 against wound inhabiting microbial pathogens. *J. King Saud Univ. Sci.* 32, 2009–2015. doi: 10.1016/j.jksus.2020.01.039
- Laihonon, P., Kalliola, R., and Salo, J. (2004). The biodiversity information clearing-house mechanism (CHM) as a global effort. *Environ. Sci. Policy* 7, 99–108. doi: 10.1016/j.envsci.2003.12.003
- Lee, S. W., Won, K., Lim, H. K., and Kim, J. C. (2007). Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 720–726. doi: 10.1007/s00253-004-1722-3
- Lei, W., Peng, Q., Long, X.-F., Zhang, S., Zhi-Gang, Z., and Yong-Qiang, T. (2016). Comparative analysis of chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activities of ethylacetate extracts of *Polygonum cuspidatum* and its endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. A0916. *Chin. J. Nat. Med.* 14, 117–123. doi: 10.1016/S1875-5364(16)60004-3
- Lincopan, N., and Trabulsi, L. R. (2008). “*Pseudomonas Aeruginosa*,” in *Microbiologia*, 5th Edn, eds L. R. Trabulsi and F. Alterthum (São Paulo: Atheneu), 369–381.
- Mahmood, A., and Kataoka, R. (2020). Metabolite profiling reveals a complex response of plants to application of plant growth-promoting endophytic bacteria. *Microbiol. Res.* 234, 126421. doi: 10.1016/j.micres.2020.126421
- Matsuura, T. (2004). *Caracterização Taxonomica de Actinomicetos Endofíticos Produtores de Antibióticos Isolados de Cupuaçuzeiro (Theobroma grandiflorum Schum.)*. Takeshi Matsuura. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
- Neves, P. R., Mamizuka, E. M., Levy, C. E., and Lincopan, N. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 47, 409–420. doi: 10.1590/S1676-24442011000400004
- Olmos, E., Mehmood, N., Husein, L. H., Goergen, J.-L., Fick, M., and Delaunay, S. (2013). Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36, 259–272. doi: 10.1007/s00449-012-0794-1
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., and Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* 37, 177–192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
- Pattnaik, S. S., Ranganathan, S., Ampasala, D. R., Syed, A., Ameen, F., and Busi, S. (2018). Attenuation of quorum sensing regulated virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by *Diaporthe phaseolorum* SSP12. *Microb. Pathog.* 118, 177–189. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.031
- Pinheiro, E. A. A., Pina, J. R. S., Feitosa, A. O., Carvalho, J. M., Borges, F. C., Marinho, P. S. B., et al. (2017). Bioprospecting of antimicrobial activity of extracts of endophytic fungi from *Bauhinia guianensis*. *Rev. Argent. Microbiol.* 49, 3–6. doi: 10.1016/j.ram.2016.08.005
- Pitt, I. (1979). *The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*. New York, NY: Academic Press.
- Pitt, I., and Samson, R. A. (1990). Approaches to *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. *Stud. Mycol.* 32, 77–90.
- Rajamani, T., Suryanarayanan, T. S., Murali, T. S., and Thirunavukkarasu, N. (2018). Distribution and diversity of foliar endophytic fungi in the mangroves of Andaman Islands, India. *Fungal Ecol.* 36, 109–116. doi: 10.1016/j.funeco.2018.09.007
- Raju, R., Gromyko, O., Fedorenko, V., Luzetskyy, A., and Müller, R. (2014). Albalflavonol B, a new sesquiterpene isolated from the terrestrial actinomycete, *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 68, 286–288. doi: 10.1038/ja.2014.138
- Rapper, K. B., and Fennell, I. (1965). *The Genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Sader, H. S., Gales, A. C., Pfaller, M. A., Mendes, R. E., Zoccoli, C., Barth, A., et al. (2001). Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz. J. Infect. Dis.* 5, 200–214. doi: 10.1590/S1413-86702001000400006
- Santhakumari, S., and Ravi, A. V. (2019). Targeting quorum sensing mechanism: an alternative anti-virulent strategy for the treatment of bacterial infections. *S. Afr. J. Bot.* 120, 81–86. doi: 10.1016/j.sajb.2018.09.028
- Santiago, I. F., Alves, T. M. A., Rabello, A., Sales Junior, P. A., Romanha, A. J., Zani, C. L., Rosa, C. A., and Rosa L. H. (2012). Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia Antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles* 16, 95–103. doi: 10.1007/s00792-011-0409-9
- Santiago, I. F., Alves, T. M. A., Rabello, A., Sales Junior, P. A., Romanha, A. J., Zani, C. L., Rosa, C. A., and Rosa L. H. (2012). Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia Antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles* 16, 95–103. doi: 10.1007/s00792-011-0409-9
- Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., and Raut, S. (2016). Review on bacterial biofilm: an universal cause of contamination. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 56–66. doi: 10.1016/j.bcab.2016.05.002
- Shirling, E. B., and Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species1. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 16, 313–340. doi: 10.1099/00207713-16-3-313
- Silva, R., Roberta, B. F., Silva, T. D., and Macedo, A. J. (2019). Alternative method in *Galleria mellonella* larvae to study biofilm infection and treatment. *Microb. Pathog.* 137:103756. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103756

- Singh, H., Naik, B., Kumar, V., and Bisht, G. S. (2018). Screening of endophytic actinomycetes for their herbicidal activity. *Ann. Agrar. Sci.* 16, 101–107. doi: 10.1016/j.aasci.2017.11.001
- Stepanoviæ, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukiæ, S., Cirkoviæ, I., et al. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS* 115, 891–899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Supong, K., Thawai, C., Choowong, W., Kittiwongwattana, C., Thanaboripat, D., Laosinwattana, C., et al. (2016). Antimicrobial compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72023 isolated from rice (*Oryza sativa* L.). *Res. Microbiol.* 167, 290–298. doi: 10.1016/j.resmic.2016.01.004
- Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Preedanon, S., Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., et al. (2008). Epoxydons and a pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. *J. Nat. Prod.* 71, 1323–1326. doi: 10.1021/np8002595
- Van Nguyen, H., Truong, P. M., Duong, H. T., Dinh, H. M., and Nguyen, C. H. (2019). Genome sequence data of *Streptomyces* sp. SS52, an endophytic strain for daidzein biosynthesis. *Data Brief* 27:104746. doi: 10.1016/j.dib.2019.104746
- Walkman & Henrici (1943). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 2452–2492.
- World Health Organization (2015). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization (WHO) (2018). *Leishmaniasis Fact Sheet*. Available online at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed August 12, 2020).
- Younis, K. M., Usup, G., and Ahmad, A. (2016). Secondary metabolites produced by marine streptomyces as antibiofilm and quorum-sensing inhibitor of uropathogen *Proteus mirabilis*. *Environ. Sci. Poll. Res. Int.* 23, 4756–4767. doi: 10.1007/s11356-015-5687-9
- Zgoda, J. R., and Porter, J. R. (2001). A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm. Biol.* 39, 221–225. doi: 10.1076/phbi.39.3.221.5934

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Amorim, Castro, Souza, Alves, Dias, Melo, da Silva, Villis, Bonfim, Falcai, Silva, Monteiro-Neto, Aliança, da Silva and de Miranda. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.