Bioprospecção e avaliação do potencial antimicrobiano de actinobactérias do solo rizóide de açaí (*Euterpe oleracea*) no Município de Igarapé-Açú no estado do Pará

Bioprospecting and evaluation of the antimicrobial potential of açaí rhizoid soil actinobacteria (*Euterpe oleracea*) in the Municipality of Igarapé-Açú in the state of Pará

DOI:10.34117/bjdv7n6-692

Recebimento dos originais: 07/05/2021
Aceitação para publicação: 01/06/2021

Fabyanne Silva de Oliveira
Graduanda em Biomedicina
Universidade do Estado do Pará
Endereço: Avenida João Paulo II, 972 - Marco, Belém - PA, 66095-492
E-mail: fabyanneoliveiraa@gmail.com

Bruna Ferreira de Carvalho
Graduanda em Biomedicina
Universidade do Estado do Pará
Endereço: Avenida João Paulo II, 2160 - Curió-Utinga, Belém - PA, 66610-770
E-mail: bruna.ferreira0828@gmail.com

Fernanda Batista Martins
Graduanda em Biomedicina
Universidade do Estado do Pará
Endereço: Rua do Fio, Quadra 15, 76 - Novo Horizonte, Marituba - PA, 67200-000
E-mail: fabyanneoliveiraa@gmail.com

Nilson Veloso Bezerra
Biomédico, Dr. em Entomologia
Universidade do Estado do Pará
Endereço: Avenida Almirante Barroso, s/n, Belém - PA
E-mail: nbezerra@yahoo.com

RESUMO

A diversidade microbiológica encontrada nos solos, principalmente em solos rizosféricos, ainda é pouco conhecida e estudada, bactérias, como as pertencentes ao grupo das actinobactérias, fazem parte destes ambientes e possuem alto potencial biotecnológico quando se avalia as substâncias produzidas em seu metabolismo secundário. Foram coletadas 30 amostras de solo rizosférico destinado ao cultivo de hortaliças com o objetivo de avaliar a ocorrência de actinobactérias nestes locais e verificar seu potencial para a produção de substâncias antibacterianas. Foram isoladas 21 amostras de bactérias com características de actinobactérias e duas delas apresentaram potencial de inibição ao crescimento de bactérias consideradas patogênicas.

Palavras chaves: Actinobactérias, Solos Rizosféricos, Potencial Antibacteriano.

ABSTRACT
The microbiological diversity found in soils, mainly in rhizospheric soils, is still little known and studied, bacteria, such as those belonging to the group of actinobacteria, are part of these environments and have high biotechnological potential when evaluating the substances produced in their secondary metabolism. Thirty samples of rhizospheric soil were collected for the cultivation of vegetables in order to evaluate the occurrence of actinobacteria in these places and to verify their potential for the production of antibacterial substances. 21 samples of bacteria were isolated with characteristics of actinobacteria and two of them showed potential to inhibit the growth of bacteria considered pathogenic.

Keywords: Actinobacteria, Rhizospheric Soils, Antibacterial Potential.

1 INTRODUÇÃO

O solo constitui um ecossistema complexo e heterogêneo, sua diversidade microbiológica ainda não é totalmente conhecida, mas sua importância pode ser observada em vários ramos da sociedade e do meio ambiente (OLIVEIRA e BRANCO, 2018). Este elemento desempenha funções essenciais à vida, como a ciclagem e o armazenamento de nutrientes, todavia, com o passar dos anos, este meio tem sofrido transformações como degradação, erosão, desmatamento, queimadas dentre outras agressões que comprometem sua estrutura físico-química (OLIVEIRA, 2014).

Terras agricultáveis contem uma variedade de microrganismos, de modo a promover o crescimento das plantas, elevar a biodiversidade, manter a microbiota, a manutenção da fertilidade e nutrientes no solo (MIRANDA, 2019; DA SILVA, 2020). Dentre essa diversidade microbiana destacam-se as actinobactérias, organismos que se adaptam às diversas condições do ambiente, sendo capazes de colonizar a rizosfera e tecidos internos das plantas, na forma de endófitos produzindo metabólitos e compostos com potencial biotecnológico (PETI, 2016).

As actinobactérias estão entre as 18 principais linhagens e representam uma das maiores unidades taxonômicas dentro do domínio Bacteria. São bactérias Gram positivo, filamentosas, possuem 6 classes, 52 famílias e 232 gêneros (SATHYA; VIJAYABHARATHI; GOPALAKRISHNAN, 2017), possuem em seu DNA numerosas sequências de Guanina e Citosina (G+C), considera-se que as actinobactérias reproduzem-se principalmente por meio da formação de esporos, que por meio deste, originam-se novos organismos (BARKA *et al*, 2016), são produtores de metabólitos secundários que podem ser introduzidos na indústria alimentícia, farmacêutica e na

agricultura (VARGAS HOYOS, 2018). Apesar de estarem envolvidas em diferentes setores, as actinobactérias possuem uma notável ação no seu grande potencial em produzir antibióticos. Cerca de 50% dos antibióticos conhecidos são produzidos por estes microrganismos, sendo o gênero *Streptomyces* responsável por 90% destes metabólitos bioativos (DE OLIVEIRA, 2020). Este gênero produz diversos antibióticos, dentre os quais pode-se citar aminoglicosídeos, macrolídeos, ansamicinas e cefalosporinas (MELO, 2009).

Por este motivo, as actinobactérias têm propiciado intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas visando potenciais aplicações destes produtos para tratamento de doenças. Nesse contexto, a busca por espécies desse gênero com potencial biotecnológico e o estudo da microbiota dos solos amazônicos tem se mostrado fundamental para a descoberta e produção de novas substâncias e drogas com atividade antimicrobiana (DE JESUS, 2018).

2 OBJETIVO

Caracterizar e avaliar o potencial antibacteriano da microbiota de solos cultivados de açaí (*Euterpe oleracea*) na cidade de Igarapé-Açú, Pará.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO E AMOSTRA

Trata-se de um estudo experimental e descritivo, que utilizou amostras de solos rizosféricos de plantio de açaí localizado no município de Igarapé-Açú no estado do Pará

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 30 amostras, em média 100 g, de solo com o auxílio de espátulas e acondicionadas em sacos descartáveis e estéreis e transportadas em temperatura ambiente até o Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Estado do Pará – CCBS/UEPA (LABMICRO - CCBS/UEPA).

3.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

As amostras foram diluídas em solução salina estéril à 0,9% (1g/10 ml), resultando na concentração de 0,1g/ml, e submetidas a agitação por 5 minutos para homogeneização, após repouso de 30 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi semeado com alças descartáveis nos meios de cultura Ágar Czapek Dox (CZD), Ágar Saboraund +

Nistatina (SA+N) e Caldo TSB + Nistatina (TSB+N) e incubados em estufa bacteriológica, em câmara úmida, à 35ºC por 48 horas.

As colônias bacterianas visíveis foram classificadas de acordo com características macroscópicas como forma, aspecto, densidade e cor de acordo com o meio de cultura utilizado. A classificação microscópica foi realizada em esfregaços de cada colônia pelo método de coloração de Gram (ANVISA, 2013).

3.4 MICROCULTIVO

A técnica de microcultivo foi realizada em placas contendo meio Ágar Saboraund + Nistatina, onde as colônias foram semeadas em método de estrias curtas e foi inserido ao meio, em inclinação de 45º, uma lamínula no local onde a semeadura foi realizada e incubadas em estufa bacteriológica a 35ºC por 48h de câmara úmida.

A avaliação do microcultivo foi feita retirando a lamínula e colocando sobre uma lâmina e adicionada 1 gota de azul de metileno diluído em água destilada (1:1). A visualização foi feita em microscopia ótica (400x).

3.5 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

O potencial de inibição do crescimento de outras bactérias foi realizado através do teste de difusão em poços, cepas de *Escherichia coli* foram testadas para avaliar o potencial das actinobactérias isoladas, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica, em câmara úmida, a 35ºC por 24 a 48 h. Considerou-se como potencial a formação de halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos poços.

4 RESULTADOS

Foram isoladas 21 bactérias nas placas de Petri contendo os meios Ágar Czapek Dox, Ágar Saboraund + Nistatina, assim como, nos tubos contendo o meio Caldo TSB + Nistatina,. As colônias bacterianas foram classificadas macroscopicamente, sendo observadas 5 diferentes tipos, colônias rugosas secas e mucóides com borda regulares e irregulares sem pigmento foram as mais frequentes, colônias algodonosas também foram isoladas em menor frequência, variando a ocorrência de pigmentação (Tabela 1).

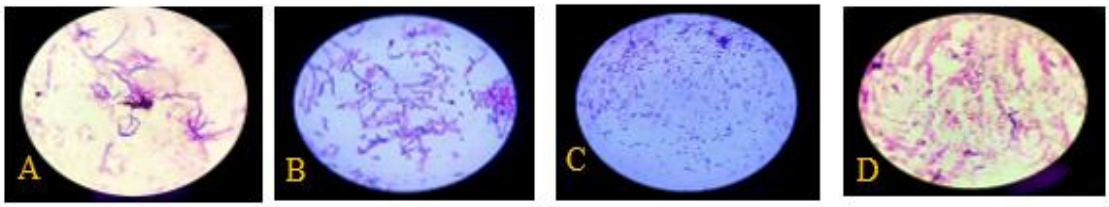
Tabela 1: Característica macroscópicas de colônias bacterianas isoladas no meio Ágar bacterianas isoladas no Czapek Dox:

Característica da colônia	Pigmento			
	N	%	N	%
Mucóide com bordas regulares	S: 20	66,7	C: 03	10,0
Mucóide com bordas irregulares	S: 12	40,0	C: 06	20,0
Rugosas secas com borda irregular	S: 01	03,3	C: -	00,0
Rugosas mucóide com borda regular	S: 24	80,0	C: 13	43,3
Algodonosa	S: 18	60,0	C: 02	06,7

Legenda: S: Sem; C: Com.
Fonte: Autores.

A análise microscópica das colônias bacterianas obtidas após incubação foi realizada através de microscopia ótica (aumento de 1000x) em esfregaços confeccionados sobre lâminas de vidro corados através da técnica de coloração de Gram, foram evidenciados principalmente a presnça de bacilos Gram positivos pleomórficos, isolados ou formando arranjos (em pares ou em cadeias), a técnica permitiu evidenciar a formação de estruturas semelhantes a esporos entre as formas bacterianas (Figura 1).

Figura 1: A - Bacilos Gram positivos alongados isolados em pares; B - Bacilos Gram positivos em cadeias curtas; C- Bacilos Gram positivos curtos isolados; D - Bacilos Gram positivos com formação de esporos.



Fonte: Autores

A partir da caracterização macroscópica e microscópica das colônias bacterianas, foi feito a correlação entre as duas formas de caracterização, as quais foram descritas na Tabela 2.

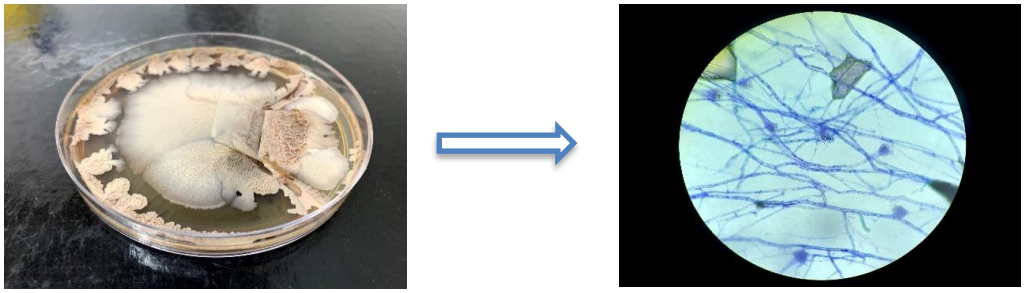
Tabela 2: Características microscópicas de colônias bacterianas isoladas em rizosfera de açaí.

Tipo de Colônia	**Característica Microscópica**
Mucóide com bordas regulares	Bacilos Gram positivos curtos isolados.
Mucóide com bordas irregulares	Bacilos Gram positivos curtos isolados.
Rugosas secas com borda irregular	Bacilos Gram positivos alongados isolados ou em pares.
Rugosas mucóide com borda regular	Bacilos Gram positivos em cadeias longas.
Algodonosa	Bacilos Gram positivos com formação esporos

Fonte: Autores.

As estruturas de reprodução, observadas em microscopia ótica (400x) após micro cultivo demonstraram a formação de pseudo hifas longas com esporos ao longo de toda a estrutura semelhantes ao gênero *Streptomyces* (Figura 2).

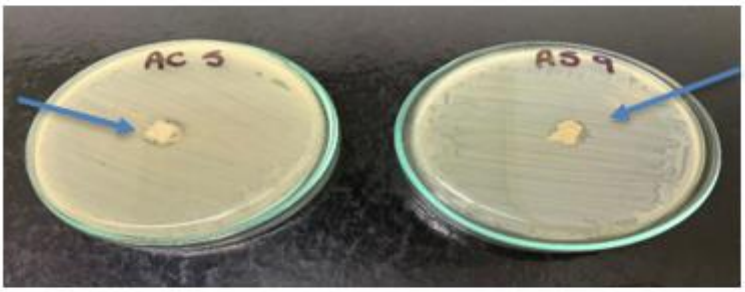
Figura 2: Visualização de estruturas de reprodução após micro cultivo demonstrando a formação de pseudo hifas hifas longas com esporos ao longo de toda a estrutura.



Fonte: Autores

A atividade antimicrobiana para a cepa de *E. coli* selecionada, mostrou que das vinte colônias isoladas, apenas duas apresentaram atividade antimicrobiana (figura 3).

Figura 3: Halos de inibição de crescimento ao redor das colônias de actinobactérias.



Fonte: Autores.

5 DISCUSSÃO

As características morfológicas das actinobactérias são diversas e muito heterogêneas, a maioria dos autores descreve esse grupo de bactérias como bacilos Gram positivos filamentosas, podendo apresentar variações em sua morfologia que vão desde cocobacilos até bacilos longos e delgados isolados ou em cadeias que podem originar estruturas semelhantes a hifas ramificadas e esporos ao longo da cadeia (BARKA, 2016; LI, 2016), as caracterização macroscópicas e microscópica das bactérias isoladas nesta pesquisa, descritas na tabela 1, tabela 2 e figura 1, assemelham-se as descrições feita pelos autores, confirmando a ocorrência deste grupo morfológico na rizosfera estudada.

De acordo com Goodfellow et al (2012) as colônias das actinobactérias apresentam-se, em meio de cultura sólido, grande diversidade de aspectos, podem ter sua superfície variando de lisa a rugosa, podendo também apresentarem-se como colônias filamentosas semelhantes a colônias fúngicas, suas margens são irregulares podendo apresentar um aspecto granular, enrugadas e aveludadas, as características coloniais das bactérias obtidas em rizosfera de açaí (*Elais guineensis*) apresentaram as características descritas pelo autor (Tabela 1 e 2), associada ao aspecto microscópico descrito, essas características reforçam a hipótese da ocorrência deste grupo bacteriano na rizosfera desta planta.

Com relação à atividade antimicrobiana, demonstrou-se que duas cepas isoladas foram capazes de inibir o crescimento da bactéria patogênica *Escherichia coli*, tal achado assemelha-se aos actinomicetos isolados por Azuma (2011) no Paraná, Liberal et al (2018), e Mohamed (2017), cujos também obtiveram resultados com atividade antimicrobiana contra bactérias gram negativas.

Observou-se que a produção de moléculas bioativas inibidoras do crescimento bacteriano ocorreu na fase estacionária do crescimento microbiano, conforme Kumar et al. (2014) e De oliveira & Branco (2018), os quais destacam que isto ocorre porque coincide com a escassez de nutrientes, levando as bactérias a competirem por substratos. Nesse sentido, o presente trabalho evidencia a importância de compostos antibacterianos provenientes das actinobactérias, todavia, bioensaios mais aprofundados são necessários.

6 CONCLUSÃO

As bactérias presentes no solo rizosférico amazônico demonstraram potencial biotecnológico e a bioprospecção de actinobactérias é importante e necessária neste contexto, já que essas bactérias representam a maior de fonte de antibióticos conhecida.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial destes microrganismos de ambientes amazônicos na obtenção de novos produtos de uso industrial e medicinal, os produtos resultantes do metabolismo secundário das actinobactérias, em especial do gênero *Streptomyces*, podem caracterizar e determinar um novo capítulo no combate às infecções causadas por bactérias multirresistentes, a pesquisa de novas espécies nestes ambientes e a análise do mecanismo de ação de seus metabólitos com atividade antimicrobiana requer estudos mais aprofundados para avaliar e descrever sua capacidade de contribuir para o tratamento de infecções bacterianas.

REFERÊNCIAS

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final.** ANVISA – Brasília. 2013.

AZUMA, Mariana Vieira Porsani. **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da Região Entre-Marés da Ilha do Mél, PR, Brasil**. 2012.

BARKA, Essaid Ait et al. **Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

DA COSTA, Anderson Luiz Pena; JUNIOR, Antonio Carlos Souza Silva. **Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura**. Estação Científica (UNIFAP), v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DA SILVA, Alasse Oliveira et al. **Estudo da produção de açaí (Euterpe oleracea Mart): aspectos econômicos e produtivos baseados nos anos de 2015 a 2017./Açaí (Euterpe oleracea Mart) production study: economic and productive aspects based on 2015-2017**. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 1, p. 1629-1641, 2020.

DA SILVA, Geny Rocha; PAULETTO, Daniela; SILVA, Arystides Resende. **Dinâmica sazonal de nutrientes e atributos físicos do solo em sistemas agroflorestais.** Revista de Ciências Agrárias Amazon Journal of Agricultural and Environmental Sciences, v. 63, 2020.

DE JESUS PAIXÃO, Cléverton et al. **Produção de antibióticos a partir de actinobactérias: uma revisão de literatura**. Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq, n. 19, 2018.

DE OLIVEIRA, Jackelly Felipe et al. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de Streptomyces hygroscopicus**. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 8, p. 55097-55106, 2020

DE OLIVEIRA, Raimundo Carmo; BRANCO-AC, R. I. O. **Potencial antimicrobiano de actinomicetos de solos amazônicos**. 2018.

DE MELO, F. M. P. **Bioprospecção de actinobactérias rizosféricas de milho (Zea mays L.) com atividade antifúngica**. Embrapa Meio Ambiente-Tese/dissertação (ALICE), 2009.

DUARTE, Mariana Wanderley. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo: produção de metabólitos secundários por actinomicetos de solo**. 2009.

FERREIRA, Enderson Petrônio de Brito; STONE, Luis Fernando; MARTIN-DIDONET, Claudia Cristina Garcia. **População e atividade microbiana do solo em sistema agroecológico de produção**. Revista Ciência Agronômica, v. 48, n. 1, p. 22-31, 2017.

GOODFELLOW, Michael et al. (Ed.). **Bergey's manual® of systematic bacteriology: Volume five the actinobacteria, part a.** Springer New York, 2012.

KUMAR, P. S.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. **Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil Streptomyces sp**. SCA 7. Kaohsiung Journal of Medical Sciences, v. 30, n. 9, p. 435-446, 2014.

LI, Qinyuan et al. **Morphological identification of actinobacteria**. Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. Rijeka, Croatia: InTech, p. 59-86, 2016.

LIBERAL, Talita Cunha de Faria et al. **Isolamento, caracterização e atividade antimicrobiana de metabólitos secundários produzidos por Streptomyces sp. de solo amazônico**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Oeste do Pará.

MIRANDA, Pedro Henrique Costa de et al. **Atributos biológicos como indicadores de qualidade do solo em diferentes coberturas do solo na agricultura familiar**. 2019.

MOHAMED, Harir et al. **Isolation and characterization of actinobacteria from Algerian sahara soils with antimicrobial activities**. International journal of molecular and cellular medicine, v. 6, n. 2, p. 109, 2017.

OLIVEIRA, Ana Paula Guedes et al. **Importância das actinobactérias em processos ecológicos, industriais e econômicos**. Enciclopédia Biosfera, v. 18, p. 3938-3952, 2014.

OLIVEIRA, Luiz Antonio de et al. **Diversidade Microbiana da Amazônia Vol. 3**. 2020.

ORTEGA, Letícia de Lima et al. **Resistência bacteriana: aquisição, mecanismos e prevenção**. 2019.

PETI, Ana Paula Ferranti. **Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SATHYA, Arumugam; VIJAYABHARATHI, Rajendran; GOPALAKRISHNAN, **Subramaniam. Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes**. 3 Biotech, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2017.

VARGAS HOYOS, Harold Alexander. **Actinobactérias de biomas brasileiros: biodiversidade e potencial de uso na agricultura**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.