

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE CIANOBACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES HÍDRICOS

CAMILA KUNZ ZAMPROGNA<sup>1</sup>, CHARIANE WERLANG<sup>1</sup>, RAQUEL ZENI TERNUS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Comunitária de Chapecó (UNOCHAPECÓ)

### RESUMO

Organismos aquáticos são reconhecido como potenciais reservatórios de produtos naturais biativos. Neste contexto, cianobactérias tem surgido como uma fonte promissora destes compostos. O objetivo deste trabalho foi estudar características biológicas e potencial biotecnológico de metabólitos secundários de cianobactérias isoladas em ambientes hídricos da região oeste catarinense. As amostras foram coletadas em ambientes naturais, em zona urbana e zona rural. Os cultivos foram feitos em meio BG-11 e os testes de atividade antimicrobiana realizados pelo teste de capacidade antimicrobiana por disco difusão. O ensaio foi realizado em Placa com Ágar Mueller testando os isolados de cianobactérias frente a 5 micro-organismos (*Bacillus cereus*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*). Resultados de halos de inibição, variando de 7 a 14 mm foram obtidos para *Staphylococcus aureus*, indicando o potencial bioativo.

Palavras-chave: Cianobactéria, atividade antimicrobiana, microbiologia, *Geitlerinema* sp.

### ABSTRACT

Aquatic organisms are recognized as potential reservoirs of natural biactive products. In this context, cyanobacteria have emerged as a promising source of these compounds. The objective of this work was to study biological characteristics and biotechnological potential of secondary metabolites of cyanobacteria isolated in water environments of the western region of Santa Catarina. Samples were collected in natural environments, in urban and rural areas. The cultures were made in BG-11 medium and the antimicrobial activity tests performed by the antimicrobial capacity test by disk diffusion. The assay was performed on Mueller Agar Plate by testing the cyanobacterial isolates against 5 microorganisms (*Bacillus cereus*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*). Inhibition halos results, ranging from 7 to 14 mm were obtained for *Staphylococcus aureus*, indicating the bioactive potential.

Keywords: Cyanobacteria, antimicrobial activity, microbiology, *Geitlerinema* sp.

### INTRODUÇÃO

Apesar de serem considerados organismos típicos de águas eutróficas, e de ocorrerem especialmente em águas de temperatura elevada, as cianobactérias podem ser encontrados em praticamente todos os ecossistemas aquáticos, desde nascentes termais com pH < 5

(BROCK, 1973; SHAPIRO, 1984), lagos, lagoas, estuários, oceanos, vivendo também no solo em simbiose com plantas ou com fungos (PAERL, 1991).

Na busca de novos empreendimentos econômicos, os reservatórios artificiais de geração de eletricidade têm sido construídos na re-

gião do alto rio Uruguai, causando decréscimo na qualidade da água da região (TERNUS et al., 2011). Este fator, associado ao enriquecimento dos corpos d'águas com nutrientes provenientes de esgotos urbanos, efluentes provenientes de atividades agropastoris e industriais, com altas cargas de nitrogênio e fósforo (WHO, 2002), apresentam condições favoráveis para a ocorrência de florações de cianobactérias (OLIVEIRA et al., 2010).

O aumento na frequência das florações de tem produzido efeitos negativos na atividade pesqueira, na economia e na saúde humana. Sabe-se que cianobactérias, incluindo espécies dos gêneros *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Planktothrix* são capazes de produzir cianotoxinas, produtos naturais tóxicos de síntese geneticamente determinada e cujas funções ecológicas não estão completamente elucidadas (KAEBERNICK; NEILAN, 2001; CALIJURI et al., 2006; APELDOORN et al., 2007; MOLICA, AZEVEDO, 2009; SMITH; SCHINDLER, 2009).

As cianotoxinas são classificadas em hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas, em função da sua ação farmacológica (CALIJURI et al., 2006). Nos humanos, as hepatotoxinas podem provocar danos ao fígado, além de diarreias e cólicas (UENO et al. 1996; FLEMING et al. 2002). Já as neurotoxinas podem provocar tontura, adormecimento da boca e extremidades do corpo, fraqueza muscular, náusea, vômitos e taquicardia (APELDOORN et al., 2007). As dermatotoxinas, em contato com a pele e mucosas, causam irritação, podendo levar ao surgimento de sintomas como vermelhidão e lesões na pele, irritação nos olhos, conjuntivite e obstrução nasal (CALIJURI et al., 2006).

No entanto, estes compostos tem demonstrado um papel muito importante na busca por potenciais candidatos a fármacos (FRANCIS et al., 1999; TREVISAN et al., 2003). Algumas cepas também tem sido utilizadas para fins biotecnológicos, como eficientes bioissorventes de cádmio (FERRARI et al, 2004).

Embora muitos dos trabalhos de cianobactérias se foquem apenas nos aspectos dos impactos negativos destes organismos nos ecossistemas (SAMPAIO et al., 2011), têm aumentado o número de trabalhos que mostram que as cianobactérias são capazes de produzir compostos com uma atividade biológica de interesse, sendo organismos importantes na produção de oxigênio, extremamente utilizadas em estudos de fisiologia (ROENNEBERG; CARPENTER, 1993), de biologia molecular (UENO et al, 1993; MULLIGAN et al, 1994; SUGITA; SUGIURA, 1994) e de pesquisa de novos fármacos (RAO, 1994; MOLINA-GRIMA et al., 2002; PATEL et al.; 2005; ZEPKA et al., 2008).

O interesse por micro-organismos produtores de polissacarídeos de alto peso molecular tem aumentado nos últimos anos, desde que esses biopolímeros começaram a apresentar vantagens superiores aos polissacarídeos em uso (DE PHILIPPIS et al., 1998).

Os polímeros mais estudados nos últimos anos têm sido os de origem microbiana, devido a algumas vantagens de sua obtenção em relação às outras gomas, tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno, apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do micro-organismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de cultivo, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo e composição do meio de cultura (FARIA, 2002).

A aplicação industrial dos biopolímeros, de modo geral, está concentrada nos polissacarídeos extracelulares por apresentarem um processo de extração e purificação mais simples, além de possibilitar uma produtividade mais elevada (SANDFORD, 1979).

As cianobactérias são consideradas como um dos grupos de organismos mais promissores para o isolamento de novos produtos naturais bioquimicamente ativos, com potencial de aplicação biotecnológica (BURJA

et al., 2001; GERWICK et al. 1994; WRASIDLO et al. 2008; VILLA et al. 2010). Recentemente, cerca de 600 metabólitos secundários de cianobactérias foram descritos, muitos com inibição sobre várias proteínas, constituem uma fonte de produtos com potencial biológico antibacteriano, antiviral, fungicida, de inibição de enzimas, com atividade imunossupressora, efeitos citotóxicos e algicida ainda desconhecido (MUNDT et al., 2001; DOUMIT; PINOTTI, 2004; WELKER; DÖHREN, 2006; SÁNCHEZ et al., 2006; SAMPAIO et al., 2011) em diferentes taxa.

Neste sentido, este trabalho propõe-se a estudar características biológicas e potencial biotecnológico de metabólitos secundários de cianobactérias isoladas em ambientes hídricos da região oeste catarinense.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de amostras

As amostras de água foram coletadas da camada superficial, em duas datas distintas, sendo uma referente aos meses de inverno e outra aos meses de primavera, em corpos d'água da região da Bacia do Lajeado São José (27.086 59° W 052.617 32° - A1 e 27.058 02° W 052.661 57° S - A2). As amostras foram coletadas, acondicionadas e encaminhadas ao laboratório de Microbiologia da Universidade Comunitária da Região de Chapecó, onde posteriormente foram analisadas. Ainda nos locais de amostragem, foram mensuradas as variáveis temperatura, concentração de oxigênio, pH, condutividade, e todos foram mensurados com por meio de equipamento de campo.

### Cultivo, isolamento e identificação

As amostras foram homogeneizadas ao chegar ao laboratório divididas em três alíquotas de 1 ml e adicionadas a 9 ml de meio líquido BG-11 (ALLEN, 1968). Os tubos foram mantidos por 15 dias a  $28 \pm 2$  °C, sob iluminação fluorescente constante em estufa tipo DBO. Após esse período, amostras com maior densi-

dade de colônia foram transferidas para placas contendo o meio BG-11 sólido e incubadas a  $25 \pm 2$  °C durante 10 dias.

A identificação foi realizada através de microscopia óptica, utilizando como referência a chave de identificação (BICUDO e MENEZES, 2006) até o menor nível taxonômico possível. Foram observadas 15 lâminas contendo 2 gotas de amostra bruta, (RODRIGUES, 2008).

### Atividade antimicrobiana

Após o pré cultivo de cianobactérias coletadas, o método de teste de capacidade antimicrobiana por disco difusão adaptado da Norma M2-A8 (ANVISA, 2003) foi utilizado. O ensaio foi realizado em Placa com Ágar Mueller Hinton, com no máximo 5 poços em placa de 90 mm onde 100 µL de meio BG 11 com inóculo foram depositados. As colônias então serão semeadas com alça de semeadura de cobre sobre o meio já contendo o micro organismo teste. Foram testados 5 micro-organismos por amostra (*Bacillus cereus*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*). Os halos de inibição formados forma medidos depois de 18 h de incubação a  $36 \pm 1$  °C e o resultados expresso em mm de diâmetro. Todos os testes foram feitos em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As coletas em meio rural e urbano feitas durante o ano de 2016 demonstraram padrões de ausência de floração clorofilada em detrimento de floração superficial com característica espectral, ou seja, a formação de mucilagem incolor na superfície aquática. Porém, quando as amostras foram inoculadas em meio nutritivo BG-11 formaram colônias visíveis a olho nu, com estruturas características de cianobactérias.

A amostra 1 foi coletada em ambiente urbano e amostra 2 na zona rural. A quantidade de táxons e diversidade observada nas amostras foi baixa, variando de dois a três, sendo que a amostra 1 apresentou exemplares de *Geitlerinema* sp. e *Calothrix* sp., ambos filamentosos.

Já a amostra 2 demonstrou a presença de três táxons, um deles comum a ambas as amostras *Geitlerinema* sp. assim como a Ordem Oscillatoreales e *Microcystis* sp., esse último sendo alvo de diversas pesquisas ao longos dos últimos anos e reconhecidamente potente como algicida, bactericida e tendo efeitos citotóxicos significativos (SHAMSOLLAHI et al, 2014). Com relação às variáveis físico-químicas, o pH (Tabela 1) de ambas amostras apresentou valores abaixo do estabelecido como ideal para ciclagem de nutrientes e desenvolvimento de micro-organismos como cianobactérias. É esperado, considerado que os corpos hídricos estudados são lênticos, que foram impactados com algum tipo de atividade antrópica, sofreram lixiviação e por consequência, enriquecimento nutritivo e queda no oxigênio dissolvido (OD) disponível.

**Tabela 1.** Variáveis químicas e ambientais medidas em campo para Amostra 1 (A1) e Amostra 2 (A2).

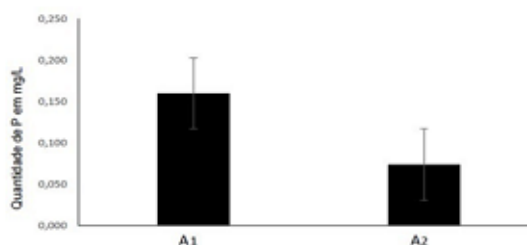
Altitude	667m	630m
Temperatura Ambiente	24°C	25°C
Temperatura da água	17°C	18,5°C
pH	6,97	6,91

A resolução nº 357 do CONAMA, de 17 de março de 2005 recomenda níveis máximos de fosfato total de 0,020 mg/L e nitrogênio (nitrato) 10,0 mg/L para águas doce de classe 1 e 2. A concentração de fosfato em ambas amostras são quase 100 vezes maior que o recomendando (Figura 1).

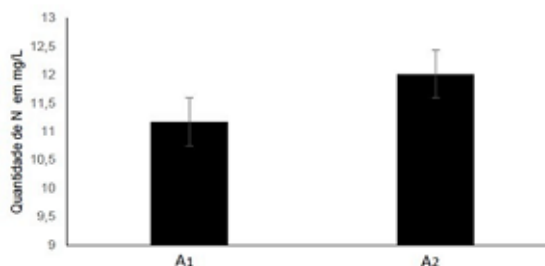
Esse tipo de enriquecimento pode estar relacionado a eventos de a lixiviação por meio de chuvas ou escoamento superficial e putrefação de matéria orgânica, já que a vegetação do entorno do ambiente urbano é rica em gramíneas com cobertura parcial do solo por plantas herbáceas, logo o corpo de água está mais exposto a nutrientes ao transporte e deposição de fósforo, assim como nitrogênio (Figura 2).

No ambiente rural o corpo de água está protegido por vegetação rica em herbáceas e arbóreas, mesmo que a altitude influencie na inclinação e por consequência na possibilidade de maior entrada de nutrientes de fonte alóctone a cobertura do solo é maior e mais rica em herbáceas e arbóreas, portanto a possibilidade de eutrofização por lixiviação é menor. Mesmo assim, o nível de nitrogênio no ambiente rural é maior (Figura 3), considerando que esse ambiente está em meio a uma variada esfera de propriedades vizinhas que praticam agricultura intensiva de vários gêneros, que também é comum na propriedade. Devido a aplicação de fertilizantes e pesticidas regularmente nas culturas do entorno do copo de águas amostrado, que pode facilmente ser lixiviado, ao longo do tempo com o regime de chuvas e também irrigação utilizada para hortaliças.

**Figura 1.** Concentração de fósforo total nas amostras coletadas em ambiente urbano (A1) e rural (A2).



**Figura 2.** Concentração de nitrogênio nas amostras coletadas em ambiente urbano (A1) e rural (A2).



A partir dos ensaios de difusão realizados para inibir o crescimento de micro-organismos (*Bacillus cereus*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*), foi possível verificar a formação de halo significativo apenas no meio de cultura com inóculo de *Staphylococcus aureus*, apresentando halo de inibição entre 7mm a 14mm.

Silva et al. (2010), em pesquisa com cianobactéria *Chlorogloea* CENA152, obtiveram resultados eficientes com atividade antimicrobiana nos extratos de solvente orgânico de acetato de etila e etanol. Dentre as bactérias submetidas aos ensaios, as que apresentaram halo de inibição entre 7 a 9 mm de diâmetro foram *S.indica*, *X.perlagoni*, *B. cereus*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *M. luteus* e *S. pasteurii* para o solvente acetato de etila. Já para o etanol sua eficiência foi menor apresentando inibição do crescimento das bactérias *Salmonella* typhimurium, *E. faecalis*, *E. coli* e *S.aureus* com halos de inibição entre 5,5 mm a 9 mm.

Apesar dos resultados satisfatórios com relação à bactéria *Staphylococcus aureus*, mais ensaios se fazem necessários para verificar a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de cianobactérias. Pesquisas como esta contribuem com o aumento de informações e abrem caminho para o desenvolvimento de antimicrobianos e complexos enzimáticos de interesse biotecnológico.

## CONCLUSÃO

- A sazonalidade e condições tróficas do ambiente aquático é fator determinante para crescimento ou não de grupos de cianobactérias;
- Os ambientes pesquisados apresentaram baixa diversidade de cianobactérias.
- O meio de cultura ASM -1 mostrou-se pouco eficaz no crescimento de cianobactérias.
- Cianobactérias isoladas de ambientes hídricos da região possuem potencial antimicrobiano. Estudos ainda devem ser concluídos para confirmação da atividade antimicrobiana das substâncias puras.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, M M, Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates, J. Phycology, 4 (1968) 1-3.
- APELDOORN, ME. van, EGMOND, HP. van, SPEIJERS, GJA. and BAKKER, GJL. Toxins of cyanobacteria. Mol. Nutr. Food Res., 2007, vol 51, p. 7-60.
- APHA (American Public Health Association). American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed. APHA, Washington, DC.
- BROCK T.D.. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. Science, 1993, 197:480-489.
- BURJA, A. et al. Marine cyanobacteria: a profile source of natural products. Tetrahedron, v. 57, n. 46, p. 9347-9377, 2001.
- CALIJURI, MC., ALVES, M A. and SANTOS, ACA. Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. São Carlos: Rima Editora, 2006; 118 p.
- CARVALHO, A. F. et al. Evaluation of the antibacterial activity of ethanolic and cyclohexane extracts of chamomile flowers (*Matricaria chamomilla* L.). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 16, n. 3, p. 521-526, 2014.
- DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. FE MS Microbiology Reviews, v. 22, n. 3, p. 151-175, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00365.x>>.
- FERRARI S, GUZMÁN G, SILVA P, ALCARÁZ L, SILVA H, GONZÁLEZ D. Captación de cadmio por biomasa libre o inmovilizada de *Nostoc minutum* (cianobacteria filamen



- filamentosa). *Acta Toxicol Argent.* 2004;12:19-22.
- FLEMING, L. E., RIVERO, C., BURNS, J. L., WILLIAMS, C. et al., *Harmful Algae* 2002, 1, 157–168.
- FRANCIS PT, PALMER AM, SNAPE M, WILCOCK GK 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer disease; a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 137-147.
- HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26, 2465–2466.
- KAEBERNICK, M. and NEILAN, BA. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, vol 35, p. 1-9.
- KOMÁREK J., ANAGNOSTIDIS K. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D., et al., editors. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Vol. 19/1. Stuttgart: G. Fischer; 1999. p. 1-548.
- MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 491-515, 2002.
- NEILAN, B. A.; JACOBS, D.; GOODMAN, A. E. (1995). Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl Environ Microbiol* 61, 3875±3883.
- OLIVEIRA, M. M.; SILVA FILHO, M. V.; BASTOS J. C.; NEVES M. H. C. B. Toxinas de cianobactérias e micralgas marinhas: um desafio para a ecotoxicologia aquática. *Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego, Campos de Goytacazes*, v. 4, n. 1, p. 57-80, 2010.
- PATEL, A. et al. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, v. 40, n. 2, p. 248-255, 2005.
- PAERL H.W., 1991. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria). In: *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Ed CD Sandgren, Cambridge University Press, Cambridge: 261-315.
- PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO Jr, H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25: 421-430. 2002.
- RAI, A. N. CRC handbook of symbiotic cyanobacteria. Boca Raton: CRC Press. 1990. 253p.
- RAO C.S.V.R.. Antimicrobial activity of cyanobacteria. *Indian J. Marine Sciences*, 1994, 23:55-56
- ROENNEBERG T. E CARPENTER E.J.. Daily rhythms of oxygen Evolution in the cyanobacterium *Thchodesmium thiebautii* under natural and constant conditions. *J. Interdisciph. Cycle Res.*, 1993, 24: 232-233.
- SAMPAIO, J.; CARNEIRO, R L.; PINTO, E. Potencial tóxico e farmacológico de Cianobactérias. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 4, n. 2, p. 59-75, jun. 2011.
- SHAPIRO J.. Blue-green dominance in lakes: the role and management significance of pH and CO<sub>2</sub>. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, 1984, 69(6):765-780.

- SHAMSOLLAHI.H, R, ALIMOHAMMA-DI. M, NABIZADEH. R, NAZMARA.S, A.H.MAHVI. Measurement of microcystin -lr in water samples using improved HPLC method. Global Journal of Health Science Vol. 7, No. 2; 2015.67
- SHI, XIAN-MING; ZHANG, XUE-WU; CHEN, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. Enzyme and Microbial Technology, v. 27, n. 3-5, p. 312-318, 2000.
- SILVA, C. F. ; BIAZOTTO, A. M. ; SILVA-STENICO, M. E. ; SILVA, C. S. P. ; FIORE, M. F. ; LIRA, S. P. . Cianobactérias produtoras de metabólitos secundários inibidores de proteases e com atividade antimicrobiana. In: III Simpósio Científico dos Pós-Graduandos no CENA/USP, 2010, Piracicaba. III Simpósio Científico dos Pós-Graduandos no CENA/USP, 2010.
- SMITH, VH. and SCHINDLER, DW. Eutrophication science: where do we go from here? Trends in Ecology and Evolution, 2009, vol. 24, no.4, p. 201-207.
- SNEATH, P. H. A.; JOHNSON, R. (1972). The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. J Gen Microbiol 72, 377–392.
- TERNUS, R Z et al. Influence of urbanisation on water quality in the basin of the upper Uruguay River in western Santa Catarina, Brazil. Acta Limnol. Bras. [online]. 2011, vol.23, n.2, pp. 189-199.
- TREVISAN MTS, MACEDO FVV, MEENT MV, RHEE IK, VERPOORTE R 2003. Seleção de plantas com atividade anticolinesterásica para tratamento da doença de Alzheimer. Quim Nova 26: 301-304.
- UENO T., ITO H., KOTANI H., KIMIZUKA F.E NAKAGIMA K.. Cloning and expression of the NspV restriction-modification genes of *Nostoc* sp. strain PCC 7524. Nucleic Acids Res., 1993, 21 3899.
- UENO, Y., NAGATA, S., TSUTSUMI, T., HASEGAWA, A. et al., Carcinogenesis 1996, 17, 1317–1321.
- ZAR, J. H. (1996). Biostatistical Analysis, 3rd edn. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall International.
- ZEPKA, L. Q. et al. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. Chemical Engineering and Processing, v. 47, n. 8, p. 1311-1316, 2008.