

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

João Paulo Duarte Witusk

**EFEITO DA MODIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO FRENTE À PRODUÇÃO DE COMPOSTOS
ANTIMICROBIANOS POR *Streptomyces sp.* ORIUNDO DE SOLO ANTÁRTICO**

Porto Alegre

2018

João Paulo Duarte Witusk

**EFEITO DA MODIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO FRENTE À PRODUÇÃO DE COMPOSTOS
ANTIMICROBIANOS POR *Streptomyces sp.* ORIUNDO DE SOLO ANTÁRTICO**

Trabalho de conclusão de curso de Graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli T. Van Der Sand

Coorientadora: Ms. Marcela Proença Borba

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Witusk, João Paulo Duarte
EFEITO DA MODIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO FRENTE À
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS POR
Streptomyces sp. ORIUNDO DE SOLO ANTÁRTICO / João
Paulo Duarte Witusk. -- 2018.
41 f.
Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.

Coorientador: Marcela Proença Borba.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Streptomyces. 2. Antimicrobianos . 3. Sulfatos .
4. Salinidade . 5. Ambientes Inóspitos . I. Van Der
Sand, Sueli Teresinha, orient. II. Borba, Marcela
Proença, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

João Paulo Duarte Witusk

EFEITO DA MODIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO FRENTE À PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS POR *Streptomyces sp.* ORIUNDO DE SOLO ANTÁRTICO

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovação em: 17 de Dezembro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Mercedes Passos Geimba - UFRGS

Themis Collares Antunes – UFRGS

Sueli T. Van Der Sand – UFRGS (Orientadora)

RESUMO

A grande preocupação com a ascensão da resistência a antimicrobianos levou a Organização Mundial da Saúde a liberar em 2014 um relatório com dados coletados de todas as regiões do mundo sobre a problemática da disseminação de micro-organismos resistentes a antimicrobianos, estimando que no ano de 2050, 10 milhões de óbitos serão atribuídos à resistência a antimicrobianos. Apesar de ter havido um drástico declínio na produção de antibióticos a partir da década de 1980, a descoberta, a partir de análises moleculares e genéticas, de que todo o potencial para produção de compostos bioativos ainda não foi totalmente explorado renovou o interesse em caracterizar novos compostos com atividade antimicrobiana. A abordagem de modificar o meio de cultivo para alterar o perfil de produção de metabólitos secundários pode ser uma forma eficiente e barata para se obter novos compostos antimicrobianos. Além disso, o isolamento de micro-organismos habitantes de regiões e ambientes inóspitos pode ser uma nova fonte de compostos microbianos ainda não caracterizados, e isso se deve à capacidade metabólica diferenciada destes micro-organismos, forjada pela seleção natural de espécies mais aptas a tais ambientes. Com isso, o presente trabalho se propôs a fazer uma avaliação da produção de compostos antimicrobianos de quinze isolados de *Streptomyces* provenientes do solo antártico, frente aos isolados de *Candida sp.*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Para tanto, foram realizadas alterações na composição dos meios de cultivo Agar Amido Caseína, Czapek-DOX e GYM, adicionando a esses meios diferentes concentrações de sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de magnésio e cloreto de sódio. Para fazer essa avaliação foi realizado primeiramente um ensaio para determinar as concentrações máximas toleradas pelos isolados de *Streptomyces* frente a essas substâncias. Posteriormente as concentrações obtidas foram adicionadas aos meios de cultivo e foi realizado o ensaio da dupla-camada para verificar a atividade antimicrobiana dos isolados tanto no meio controle quanto no meio modificado. Nos meios de cultivo controle somente os isolados 12 e 43 apresentaram atividade antimicrobiana, e apenas contra o isolado de *Candida sp.* A adição das substâncias modificou consideravelmente o perfil de produção dos isolados, visto que apenas três deles não apresentaram atividade antimicrobiana após as alterações dos meios de cultivo. Pode-se observar que os isolados de *Streptomyces* têm potencial para produção de compostos antimicrobianos e foi possível observar que as alterações dos meios de cultivo tiveram efeito no perfil de produção de metabólitos secundários destes isolados frente aos micro-organismos teste.

Palavras-chave: *Streptomyces*, Antimicrobianos, Sulfatos, Salinidade, Ambientes inóspitos

ABSTRACT

The great concern regarding the ascension of antimicrobial resistance led the World Health Organization to release, in 2014, a full report with data collected from all over the world about the microbial-resistant dissemination, estimating that, by the year of 2050, 10 million deaths will be attributed to infections caused by antimicrobial-resistant microorganisms. Although the drastic decline in antibiotics production started by the decade of 1980, the discovery of the unexplored potential of microorganisms to produce bioactive metabolites by applying novel molecular and genetic analysis has renewed the interest in search of novel compounds. Modifying the culture medium to shift the secondary metabolic profile produced by microorganisms is considered to be an efficient and low-cost approach to discover novel antimicrobial compounds. In addition, the isolation of microorganisms from extreme environment can serve as a new source of uncharacterized bioactive compounds due to their metabolic capacity. Therefore, the present study aims to evaluate the effect of medium composition modification on antimicrobial production from antarctic-soil *Streptomyces* isolates. To access the antimicrobial activity, the double-layer assay was used on Starch-Casein agar, Czapek-Dox and GYM media, and fifteen isolates were tested against *Candida* sp., *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. The Maximum Tolerated Concentration assay was used to determine the maximum concentration of the substances sodium chlorite, copper sulfate, ferrous sulfate and magnesium sulfate tolerated by the *Streptomyces* isolates. The obtained concentrations were applied into the media and the antimicrobial activity was determined again. On the control media, only the isolates 12 e 43 showed antimicrobial activity, and only against the *Candida* sp.strain. The addition of the different substances considerably modified the production profile of the isolates, whereas only three isolates did not show any activity on the modified media.

Keywords: *Streptomyces*, Antimicrobial, Sulfates, Salinity, Extreme environments

Sumário

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Resistência a antimicrobianos.....	7
1.2 Ambientes inóspitos.....	8
1.3 Ativando novas rotas metabólicas com a modificação do meio de cultivo	8
1.4 Filo <i>Actinobacteria</i>	9
1.5 Gênero <i>Streptomyces</i>	10
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivos Gerais	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	12
4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	26
5 REFERÊNCIAS	28
ANEXO – Normas da revista científica CurrentMicrobiology.....	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistência a antimicrobianos

Durante a última década, a resistência a antimicrobianos tornou-se uma grande preocupação no mundo todo devido ao aparecimento de novos mecanismos de resistência (1). Mesmo com a implementação de estratégias para barrar o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos, a taxa de tal fenômeno tende a aumentar inexoravelmente (2). Bactérias e outros micro-organismos de forma geral, resistentes a antimicrobianos, estão se espalhando rápida e silenciosamente por todo o globo, tornando-se um problema em constante crescimento para as instituições de saúde do mundo (3). No ano de 2014 a *World Health Organization (WHO)* publicou um relatório detalhado sobre a resistência bacteriana abordando estudos realizados em todas as regiões do mundo. Tal relatório foi publicado para alertar sobre a alarmante disseminação de bactérias resistentes a múltiplas drogas. Neste documento, a *WHO* prediz que adentraremos em uma era pós-antibiótica, onde pequenas infecções podem causar óbito pela falta de antibióticos eficazes para o tratamento (4). Algumas estimativas apontam que atualmente 700.000 mortes por ano podem ser atribuídas a micro-organismos resistentes a antimicrobianos. Apesar da dificuldade em prever tais números, estima-se que em 2050 a mortalidade atribuída à resistência a antimicrobianos possa chegar a 10 milhões de mortes anualmente, gerando custos na casa dos USD 100 trilhões de dólares (4-6).

Todas as classes de antibióticos sofreram com a emergência de resistência e em vários níveis, comprometendo sua eficácia e utilidade (7). O uso indiscriminado de antibióticos em animais, plantas e humanos, o crescimento populacional constante e o aumento da globalização facilitaram a disseminação de resistência por todo o mundo (3). Por outro lado, a taxa de desenvolvimento de novos antibióticos decaiu drasticamente desde a década de 1980, e nenhuma nova classe de antibióticos foi introduzida entre 1962 e 2000 (7, 8). Grande parte das classes de antibióticos em uso foram descobertos antes da década de 1970 e desde então a maioria dos novos compostos aprovados para uso foram criados a partir de modificações químicas nas estruturas de compostos que já existiam (9). O declínio do número de novos compostos quimicamente modificados e a recorrência em se redescobrir moléculas já conhecidas tornaram-se um obstáculo para programas que investigam novas moléculas naturais na maioria das grandes companhias farmacêuticas (10). Apesar do sucesso em modificar quimicamente compostos bioativos para produzir diferentes antibióticos, tais compostos não são capazes de substituir a necessidade de encontrar novas moléculas naturais bioativas devido às suas características químicas únicas. Análises teóricas relacionadas a características como lipofilia, tamanho, rigidez e aromaticidade mostram que produtos naturais atingem potências químicas mais amplos e diversos quando comparados a moléculas quimicamente modificadas (10-12).

Em contrapartida à diminuição da caracterização de novas moléculas e à perda de interesse da indústria farmacêutica, nas últimas décadas, em financiar trabalhos com essa finalidade, surge um novo interesse em caracterizar novos produtos naturais

produzidos por micro-organismos. Uma das razões é a exploração de ambientes inóspitos que contenham comunidades de micro-organismos com potencial diferenciado de produção de metabólitos (13, 14). Outra razão é o avanço das técnicas de sequenciamento do genoma total, que são capazes de evidenciar a alta capacidade metabólica de certos micro-organismos em produzir inúmeros compostos ainda não conhecidos (15, 16). Para explorar essa capacidade metabólica surgem abordagens como a engenharia metabólica, que visa ativar rotas metabólicas não usuais, e também novas abordagens em relação ao cultivo destes micro-organismos como forma de ativar novas rotas metabólicas a partir da modificação dos meios e condições de cultivo.

1.2 Ambientes inóspitos

Ambientes moderados possuem valores de pH próximo à neutralidade, temperaturas que variam entre 20°C a 40°C, pressão atmosférica de 1 atm e níveis adequados de água, sais e nutrientes, sendo importantes para sustentar a vida. Condições ambientais que fogem de tais limites são consideradas condições extremas. Porém, uma variedade de micro-organismos consegue sobreviver e crescer em tais condições. Esses organismos, conhecidos como extremófilos, não apenas toleram esses ambientes, mas precisam de condições extremas para seu crescimento (17). Com a problemática da redescoberta de compostos já caracterizados, uma das propostas para contornar esse problema foi a procura por micro-organismos com potencial para produção de metabólitos secundários em novos habitats e em ambientes não usuais (18). Comunidades microbianas provindas de ambientes extremos possuem um grande potencial como uma intocada fonte de novos micro-organismos de importância taxonômica. Tais micro-organismos podem representar uma nova fonte de biomoléculas resultantes de sua evolução e adaptação em termos de metabolismo (13). A exploração de regiões desérticas, solos e águas com altos níveis de salinidade, regiões profundas do oceano e a exploração de regiões polares detém um grande potencial para a descoberta de novas moléculas bioativas (18-21).

1.3 Ativando novas rotas metabólicas com a modificação do meio de cultivo

O surgimento da genômica e sua ampla utilização na década passada trouxe novas esperanças para o campo da ciência que busca novas drogas a partir de produtos naturais produzidos por micro-organismos (22). Sabe-se, hoje, que apenas uma pequena parcela de rotas de biossíntese de metabólitos é expressa em condições usuais de cultivo bacteriano, sendo a maioria dessas rotas controladas por genes críticos que necessitam de ativação para atingir um nível de produção passível de detecção (23). É sabido que a composição do meio de cultivo de micro-organismos pode causar um grande impacto na produção de compostos microbianos (24, 25). Alterações nas concentrações de glicose, fosfato ou amônio podem levar a modificações no perfil de produção de metabólitos secundários. Até mesmo aminoácidos comuns são descritos como indutores de metabolismo secundário (25). Outras moléculas que podem levar a um aumento na produção de metabólitos secundários são os chamados elementos raros da Terra. Tais elementos estão envolvidos na superexpressão de antibióticos e ativação de genes silenciados ou pouco expressos em bactérias (26). Devido à nossa falta de

conhecimento sobre a complexa sinalização biossintética dentro de uma célula e entre células, a ideia de alterar aleatoriamente condições do meio de cultivo, mimetizando mudanças ambientais, pode influenciar as rotas de biossíntese de metabólitos secundários. A abordagem de 'uma cepa, vários compostos', que consiste na promoção de alterações mínimas na composição dos meios de cultivo para modificar o perfil metabólico dos micro-organismos, é considerada bastante aleatória, porém, pode ser uma forma eficiente de obter novos metabólitos de interesse produzidos pelo mesmo micro-organismo, assim como é uma forma consideravelmente barata quando comparada com técnicas mais caras de biotecnologia genética e engenharia genética (25).

1.4 Filo Actinobacteria

O filo Actinobacteria é composto por aproximadamente 80 gêneros e é composto por bactérias Gram-positivas aeróbias (com exceções), é uma das maiores unidades taxonômicas dentre as grandes linhagens pertencentes ao domínio Bacteria (27). A maioria dos organismos pertencentes a esse filo são saprófitas de vida livre e ocupam praticamente todos os ecossistemas da Terra, tanto terrestres (em especial os estreptomicetos) quanto aquáticos (28, 29). No solo esses micro-organismos são responsáveis pela produção de compostos voláteis, como exemplo a geosmina, que os caracteriza por gerarem o odor característico de terra molhada (30). A presença desses micro-organismos no solo - local onde são mais abundantes, sendo encontrados na superfície e também a profundidades de até 2 m - é importante pelo fato de serem essenciais na reciclagem de biomateriais refratários através de decomposição e também na formação de húmus (28, 31). Como outras bactérias do solo, actinobactérias são, na grande maioria, mesofílicas, com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30°C, porém, podem habitar ambientes com temperaturas mais inóspitas (32). Como característica de seu material genético, actinobactérias possuem alto conteúdo de bases nitrogenadas guanina e citosina em seu DNA, variando de 51% em algumas corinebactérias até cerca de 70% nos gêneros *Streptomyces* e *Frankia* (33).

Actinobactérias possuem uma forma de divisão e crescimento celular bastante peculiar. Estes micro-organismos produzem um micélio e, muitos dos organismos que o produzem, acabam se reproduzindo por esporulação. De fato, as actinobactérias eram consideradas formas intermediárias entre bactérias e fungos devido ao seu crescimento característico, porém, essa comparação é apenas superficial. Como todas as bactérias, os actinomicetos não possuem compartimentalização de suas organelas celulares, possuem uma parede celular composta por peptidoglicano e são suscetíveis a agentes antibacterianos (34).

As propriedades metabólicas deste filo são bastante diversas e muitos organismos pertencentes a ele possuem habilidade para produzir um vasto leque de metabólitos secundários quimicamente diversos. São conhecidos por produzirem moléculas bioativas com propriedades antitumorais, anti-inflamatórias e antimicrobianas e, portanto, têm papel importante nas indústrias farmacêutica e biotecnológicas (35, 36). Para se ter uma ideia dessa importância, aproximadamente 60-80% dos metabólitos secundários comercialmente disponíveis para uso humano,

veterinário e na agricultura, provêm de actinobactérias, especialmente daquelas isoladas do solo (33, 36).

Apesar de todo esse potencial para produção de compostos bioativos, o filo Actinobacteria ainda não foi explorado ao máximo quanto a sua capacidade de produzir tais compostos. Com o emprego de técnicas moleculares, como o sequenciamento completo de genoma, foi possível observar que, em algumas espécies de certos gêneros desse filo, existe um potencial muito maior do que o já observado com o uso de técnicas de cultivo usuais (37), visto que hoje se sabe que em condições laboratoriais normais apenas uma pequena parcela de rotas de biossíntese de metabólitos, muitas vezes ativadas por genes crípticos, são expressas por tais micro-organismos (23). Somado a isso, existem modelos matemáticos capazes de predizer milhares de compostos antimicrobianos desconhecidos contidos nos genomas de actinobactérias (38).

1.5 Gênero *Streptomyces*

São bactérias Gram-positivas com capacidade para formação de uma camada de hifas e cadeias de esporos, processo que necessita de um metabolismo especializado e coordenado. Os esporos germinam e formam hifas com micélio aéreo multinucleado, com formação de septos com intervalos regulares que criam uma cadeia de esporos uninucleados. Em condições ambientais favoráveis, os esporos geram um tubo germinativo que levam à formação das hifas. A formação da hifa dos estreptomicetos é bastante particular pois se dá por extensão da ponta dessa estrutura, diferente de bactérias como *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* onde a alongação é realizada pela incorporação de uma nova parede celular na face lateral da célula (39-41). Devido à divisão celular, durante o crescimento vegetativo, não levar a fissão celular e sim à formação de septos que separam as hifas em compartimentos conectados, os estreptomicetos são um raro exemplo de uma bactéria multicelular, onde cada compartimento contém múltiplas cópias do cromossomo (42-44). De forma interessante, acredita-se que a pigmentação e aroma dos esporos de outras espécies podem estimular o desenvolvimento celular e produção de metabólitos secundários possibilitando, assim, que estes micro-organismos consigam sobreviver melhor em ambientes desfavoráveis (39). Quando em condições ambientais desfavoráveis, o micélio vegetativo se diferencia em estruturas esporogênicas que darão origem à hifa aérea, estrutura que facilita a dispersão de esporos. Neste momento do ciclo reprodutivo dos estreptomicetos é onde, também, a maioria dos antibióticos são produzidos (45, 46).

Os indivíduos do gênero *Streptomyces* atuam de forma importante na ecologia do solo e correspondem a aproximadamente 95% das cepas isoladas de actinobactérias, e estão entre os micro-organismos mais abundantes deste ambiente (47). Possuem papel importante na ciclagem de carbono orgânico insolúvel preso em *debris*, especialmente de plantas e fungos. Desempenham tal ação pela produção de diversas exoenzimas capazes de degradar tais produtos (48). Além disso, estreptomicetos são capazes de utilizar diversos nutrientes pela hidrólise de um variado leque de polissacarídeos (celulose, quitina, xilana e ágar) e outras macromoléculas naturais (49).

Além do papel ecológico desempenhado por micro-organismos desse gênero, os estreptomicetos são considerados um dos produtores de compostos químicos mais competentes da Natureza, pois produzem uma grande quantidade e uma grande diversidade de metabólitos secundários bioativos (50). O gênero *Streptomyces* é o maior produtor de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, sendo responsável por produzir cerca de 33% de todos os compostos dentre todos os micro-organismos (51). Portanto, são extremamente importantes para a indústria farmacêutica de forma geral. Metabólitos secundários cumprem diversas funções que beneficiam o organismo que os produz, podendo atuar como antibiótico para competir com outros micro-organismos no ambiente, atuar no transporte de metais ou como efetores no processo de diferenciação celular de bactérias produtoras de esporos (52). O metabolismo secundário evoluiu de forma diferente do metabolismo primário – essencial para crescimento celular de forma geral e que é bastante conservado em diferentes espécies. Este surge como um gerador de moléculas capazes de auxiliar na adaptação do micro-organismo, sendo que esse metabolismo varia entre diferentes espécies, assim como sua função, podendo atuar na produção de moléculas que atuam em funções fisiológicas, funções de predação ou interação entre micro-organismos (53). Desde a sua descoberta nos anos 1920, os metabólitos secundários apresentam um grande impacto na saúde humana, veterinária e na agricultura, pois muitos deles já foram ou são utilizados como fármacos anticâncer, antiparasitários, antimaláricos, imunossupressores e antimicrobianos (54).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito da modificação do meio de cultivo em relação à produção de compostos antimicrobianos produzidos por isolado de *Streptomyces sp.* provenientes de amostras de solo antártico.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Investigar o potencial antimicrobiano de quinze isolados de *Streptomyces sp.* provenientes de amostras de solo antártico frente a isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida sp.* utilizando a técnica da dupla-camada;

2.2.2 Investigar o potencial antimicrobiano desses isolados nos meios de cultivo Amido-Caseína, Czapek-Dox e GYM;

2.2.3 Determinar as concentrações máximas toleradas pelos isolados de *Streptomyces* frente às substâncias cloreto de sódio, sulfato de cobre, sulfato de ferro e sulfato de magnésio em meio Caldo Czapek-Dox;

2.2.4 Verificar o efeito da modificação dos meios de cultivo com as substâncias cloreto de sódio, sulfato de cobre, sulfato de ferro e sulfato de magnésio sobre a produção de compostos antimicrobianos produzidos pelos isolados de *Streptomyces* nos meios de cultivo Amido-Caseína, Czapek-Dox e GYM.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

EFEITO DA MODIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO FRENTE À PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS EM *Streptomyces sp.* DE SOLO ANTÁRTICO

João Paulo D. Witusk¹, Marcela P. Borba¹, Sueli T. Van der Sand¹

¹Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Abstract

Modifying the culture medium to shift the secondary metabolic profile produced by microorganisms is considered to be an efficient and low-cost approach to discover novel antimicrobial compounds. In addition, the isolation of microorganisms from extreme environments can serve as a new source of new uncharacterized bioactive compounds due to their metabolic capacity. Therefore, the present study aims to evaluate the effect of medium composition modification on antimicrobial production from antarctic-soil *Streptomyces* isolates. To access the antimicrobial activity, the double-layer assay was used on the mediums Starch-Casein, Czapek and GYM, and the fifteen isolates were tested against *Candida sp.*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. The Maximum Tolerated Concentration assay was used to determine the maximum concentration of the substances sodium chlorite, copper sulfate, ferrous sulfate and magnesium sulfate tolerated by the *Streptomyces* isolates. The obtained concentrations were applied into the media and the antimicrobial activity was determined again. On the control media only the isolates 12 e 43 demonstrated antimicrobial activity, and only against the *Candida spp.* isolate. The addition of the different substances considerably modified the production profile of the isolates, whereas only three isolates did not show any activity on the modified media.

Introdução

Durante a última década, a resistência a antimicrobianos se tornou uma das grandes preocupações no mundo todo devido ao aparecimento de novos mecanismos de resistência [1], preocupação esta que foi reforçada após a *World Health Organization (WHO)* publicar um relatório detalhado sobre estudos do mundo todo abordando dados relacionados à resistência a antimicrobianos [2]. De acordo com esse documento, entraremos em uma era pós-antibiótica, onde pequenas infecções poderão causar óbitos devido à falta de antibióticos eficazes para o tratamento. Algumas estimativas apontam que 700,000 mortes por ano são atribuídas a micro-organismos resistentes a antimicrobianos, porém, estima-se que esse número só tende a crescer. Apesar da dificuldade em prever tais números, algumas estimativas apontam que, em 2050, a mortalidade atribuída à resistência a antimicrobianos possa chegar a 10 milhões de mortes anualmente, gerando custos na casa dos USD 100 trilhões de dólares [2-4].

Com o drástico declínio da produção de novos antibióticos que teve início na década de 1980 [5, 6], a diminuição da síntese de moléculas bioativas e a recorrência

em caracterizar compostos naturais produzidos por micro-organismos já conhecidos acabou tornando-se um obstáculo para programas que trabalham com a pesquisa de produtos naturais [7]. Apesar disso, a importância em caracterizar novas moléculas produzidas por micro-organismos ainda é inegável devido às suas características químicas únicas, que se estendem em um espectro químico mais diverso e amplo quando comparadas a moléculas quimicamente modificadas [7-9].

Para escapar do problema da redescoberta de compostos já caracterizados, surgem algumas alternativas para obter novas moléculas bioativas. Uma delas é a procura por micro-organismos que habitam regiões com ambientes extremos, tais como regiões hipersalinas, vulcões, regiões profundas do mar e ambientes com temperaturas extremas [10-13]. Outra forma de obter novas moléculas produzidas por micro-organismos é pela ativação de rotas metabólicas que estão silenciadas ou pouco ativadas em condições de cultivo usuais [14]. Uma das abordagens para conseguir essa ativação é através da modificação dos fatores químicos e físicos do meio de cultivo, o que pode resultar em um grande impacto na produção de compostos microbianos [15, 16]. Tal abordagem pode ser considerada bastante aleatória, porém, pode ser uma forma eficiente de obter novos metabólitos de interesse, assim como é considerada uma abordagem mais barata quando comparada a técnicas mais caras de biotecnologia genética e engenharia genética [16].

Alguns dos micro-organismos mais valiosos para a produção de moléculas naturais bioativas pertencem ao gênero *Streptomyces*, visto que são considerados um dos produtores de compostos químicos mais competentes da Natureza [17]. Bactérias desse gênero são Gram-positivas com capacidade para formação de uma camada de hifas e cadeias de esporos [18-21]. São responsáveis pela produção de aproximadamente 33% de todos os compostos antimicrobianos produzidos por micro-organismos [22]. Visto que seu potencial metabólico para produção de compostos bioativos ainda não foi totalmente explorado [14, 23, 24], a tentativa de ativar novas rotas metabólicas por meio de modificações no meio de cultivo torna-se válida. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de produção de compostos antimicrobianos de quinze isolados do gênero *Streptomyces* provenientes do solo antártico, em diferentes meios e condições de cultivo, frente a diferentes micro-organismos.

Material e Métodos

Isolados de *Streptomyces*

Os isolados utilizados no presente trabalho são provenientes de amostras de solo antártico coletadas previamente pelo Dr. Paris Lavin (Instituto Antártico Chileno) e cedidas ao Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia da UFRGS. Os isolados foram previamente recuperados das amostras de solo e identificados como sendo do gênero *Streptomyces*.

Micro-organismos testados contra os isolados de *Streptomyces*

Para se obter um perfil de produção de compostos bioativos com atividade antimicrobiana, foram utilizados diferentes tipos de micro-organismos. Tais micro-organismos foram selecionados devido ao seu perfil de resistência a antimicrobianos apresentado em estudos previamente realizados. Dentre eles, foram utilizadas uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* (resistente aos antimicrobianos Aztreonam, Ceftazidima, Cefpodoxina, Cefotaxima, Ertapenem e Meropenem) e uma cepa de *Escherichia coli* (resistente aos antimicrobianos Aztreonam, Ceftazidima, Cefpodoxima e Cefotaxima), ambas isoladas do Arroio Dilúvio em Porto Alegre [25]. Além dessas duas bactérias, foi utilizado um isolado levedura identificado como sendo do gênero *Candida*. Esse isolado, provindo do mesmo arroio, foi selecionado devido ao seu perfil de resistência apresentado contra os antifúngicos cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B (55).

Inóculo dos isolados de *Streptomyces* para o ensaio da Dupla-camada

Para a realização deste ensaio foram selecionados 15 isolados de *Streptomyces*. Este ensaio teve como finalidade observar se os isolados testados produzem compostos bioativos capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos testes e, também, comparar diferentes meios de cultura e como eles interferem na produção desses compostos. Foi realizado o inóculo por picada, em duplicata, dos 15 isolados, utilizando agulhas bacteriológicas descartáveis, nos meios de cultura ACA, GYM e Czapek-Dox. Após o inóculo, as placas foram incubadas a 28°C por 7 dias.

Inóculo dos micro-organismos a serem testados contra os isolados de *Streptomyces*

Os isolados bacterianos e o isolado de levedura foram inoculados em meio de cultura Caldo Trypticaseína de Soja (TSB) e meio Caldo Sabouraud (SB), respectivamente, 24h antes do sétimo dia de incubação dos isolados de *Streptomyces*. Os isolados bacterianos foram incubados a 37°C enquanto que a levedura foi incubada a 28°C. Após o período de incubação a cultura líquida desses isolados foi transferida para um tubo de ensaio com solução salina para que fosse ajustada a concentração de células para aproximadamente $1,5 \times 10^8$ /mL com auxílio da escala McFarland.

Ensaio da Dupla-camada

Após o ajuste das concentrações dos inóculos dos micro-organismos utilizados, foi retirado um volume de 1 mL das suspensões de células dos isolados e esse volume foi misturado a um novo tubo de ensaio contendo 9 mL de meio Ágar Müller-Hinton (para os isolados de bactérias) ou um tubo contendo 9 mL de meio Ágar Sabouraud (para o isolado de fungo). Após a mistura da suspensão de células com o meio de cultura, essa solução foi vertida sobre as placas contendo o inóculo dos isolados de *Streptomyces*. Ao final do ensaio as placas foram incubadas a 37°C no caso dos isolados bacterianos, e o isolado de levedura a 28°C. Ambos permaneceram em incubação por até 24h.

Análise dos halos de inibição

Após o período de incubação do ensaio da dupla-camada, foi verificado se os isolados de *Streptomyces* foram capazes de inibir o crescimento microbiano levando à formação de um halo de inibição. Os isolados que apresentaram um halo de inibição foram fotografados e as imagens foram analisadas utilizando o programa de computador *ImageJ*. Com essa ferramenta foi possível medir o diâmetro dos halos de inibição, bem como o diâmetro das colônias dos isolados de *Streptomyces*. Tanto para o halo quanto para a colônia, foram aferidas as duas maiores medidas e foi calculada a média dos mesmos. Para cada isolado foi realizado o cálculo do Índice de Antibiose (IA) utilizando a fórmula (Rosato *et al.* 1981):

$$IA = \frac{\text{Média do Diâmetro do Halo}}{\text{Média do Diâmetro da Colônia}}$$

Ensaio para definir a Concentração Máxima Tolerada (CMT)

Para o presente trabalho foram propostas modificações nos componentes dos meios de cultura, seja por aumento de alguma substância ou adição de uma nova, com o intuito de verificar se tal modificação poderia alterar a produção de compostos antimicrobianos produzidos pelos isolados de *Streptomyces*. Devido a isso, foi necessário realizar uma técnica que possibilitasse verificar a concentração máxima de certa substância em que ainda fosse possível observar, a olho nu, crescimento bacteriano dos isolados de *Streptomyces*. Para isso, foi realizada a técnica de microdiluição em placas de 96 poços com fundo em "U", utilizando o meio de cultura caldo Czapek. Para o ensaio foram utilizadas quatro substâncias a serem adicionadas no meio de cultura: (a) Cloreto de sódio (concentração de 15-0,46%), (b) sulfato de magnésio (concentração de 20-0,312 mM), (c) sulfato de cobre (concentração de 20-0,312 mM) e (d) sulfato de ferro III concentração de 20-0,312 mM).

Preparo das placas de 96 poços

O preparo da placa de microdiluição consistiu em adicionar 100 µL de meio caldo Czapek-Dox em todos os poços que seriam utilizados, exceto na primeira coluna, seguido da adição de 200 µL de uma solução contendo meio caldo Czapek-Dox ajustada ao dobro da concentração inicial da substância a ser testada. Com isso foi possível fazer a microdiluição das substâncias. As duas últimas colunas foram usadas como controle positivo do inóculo e controle negativo do meio de cultura, respectivamente.

Inóculo dos isolados de *Streptomyces*

O inóculo dos isolados de *Streptomyces* foi realizado em placa de Petri contendo meio Ágar Czapek-Dox e as placas foram incubadas por 5 dias a 28°C. Após esse período foi realizada a raspagem das estruturas crescidas na placa com a adição de três mL de solução salina 0,9% estéril e auxílio de alça de Drigalski. O conteúdo da raspagem foi aliquoteado para um tubo de ensaio contendo solução salina 0,9%, onde sua turbidez foi

ajustada à escala 0,5 de McFarland. Nos moldes do documento M24-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* foi realizada uma diluição de 1:20 da suspensão de células 0,5 na escala de McFarland em meio caldo Czapek-Dox para obter o inóculo final do ensaio. Cem microlitros do inóculo final foram adicionados aos poços, exceto na última coluna, e as placas foram incubadas a 28°C por até 5 dias. Após o período de incubação foi realizada a leitura das placas para determinar até que concentração da substância testada foi observado crescimento bacteriano.

Ensaio da dupla-camada com modificações dos meios de cultura

Após definidas as concentrações toleradas das substâncias testadas para cada isolado de *Streptomyces* foi realizado o ensaio da dupla-camada novamente para avaliar se houve alguma mudança na produção de compostos com atividade antimicrobiana contra os micro-organismos citados anteriormente. Para isso, os meios de cultura ACA, GYM e Czapek-Dox foram modificados e as substâncias cloreto de sódio, sulfato de magnésio, sulfato de cobre e sulfato de ferro III foram adicionadas de acordo com o resultado obtido no ensaio anterior. Repetindo o procedimento da dupla-camada, foi possível avaliar se houve alguma mudança na produção de compostos antimicrobianos contra os micro-organismos testados. Novamente os halos foram analisados com o auxílio do programa ImageJ.

Resultados

Resultados Concentração máxima tolerada

Os resultados obtidos no ensaio da concentração máxima tolerada (**Tabela 1**), onde os isolados de *Streptomyces* foram submetidos, em meio caldo Czapek-Dox, a diferentes concentrações das substâncias cloreto de sódio, sulfato de cobre, sulfato de magnésio e sulfato de ferro, definiram as concentrações que seriam utilizadas posteriormente no ensaio da dupla-camada. Dentro dos intervalos testados, foi possível obter a concentração máxima das substâncias citadas em que os isolados de *Streptomyces* tolerariam e conseguiriam apresentar crescimento visível. Para as substâncias cloreto de sódio, sulfato de magnésio e sulfato de ferro, os isolados não mostraram diferença entre si nos valores máximos tolerados das respectivas substâncias. Para o sulfato de cobre houve variação entre os isolados, visto que dez foram capazes de crescer em concentrações de 0,625 mM, três em concentrações de 0,312 mM e dois em concentrações de 1,25 mM de sulfato de cobre (**Tabela 1**). As concentrações obtidas para cada substância foram aplicadas separadamente em cada um dos três meios de cultivo para realizar o ensaio da dupla-camada novamente.

Tabela 1. A tabela abaixo mostra as concentrações máximas em que foi observado crescimento dos isolados de *Streptomyces* dentro dos intervalos de concentração testados para as substâncias cloreto de sódio (15%-0,46%), sulfato de ferro, sulfato de magnésio e sulfato de cobre (20 mM – 0,312 mM).

Isolados	Concentrações das substâncias			
	Cloreto de sódio	Sulfato de ferro	Sulfato demagnésio	Sulfato de cobre
2	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,625 mM
4	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,312 mM
5	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,312 mM
9	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,625 mM
11	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,625 mM
12	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,625 mM
16	3,75%	1,25 mM	10 mM	1,25 mM
19	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,625 mM
22	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,625 mM
30	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,312 mM
33	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,625 mM
34	3,75%	1,25 mM	10 mM	1,25 mM
39	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,625 mM
41	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,625 mM
43	3,75%	1,25 mM	10 mM	0,625 mM

Ensaio da Dupla-camada

Meio ACA

No meio de cultivo ACA controle foi observado produção de composto antimicrobiano apenas contra o isolado de *Candida* sp. Dos 15 isolados de *Streptomyces* testados o isolados 12 e 43 foram os únicos a apresentar atividade antimicrobiana (**Tabela 2**). O melhor resultado observado foi do isolado 12, que apresentou um índice de antibiose de 11,71. Já o isolado 43 atingiu um índice de 1,87.

Dentre as modificações propostas para os meios de cultivo, o meio ACA com adição de sulfato de ferro (1,25 mM) apresentou resultados distintos quando comparado ao controle. Neste caso dois isolados se mostraram capazes de inibir o crescimento do isolado de *Candida* (**Tabela 2**). O isolado 19, que não havia apresentado atividade anteriormente, teve um índice de antibiose de 5,10. O isolado 43 novamente atingiu valores semelhantes ao controle (índice de antibiose de 1,61). De forma interessante, a adição de sulfato de cobre ao meio ACA impossibilitou o cultivo dos isolados de *Streptomyces* nesse meio de cultivo, apesar de o ensaio da concentração máxima tolerada tenha mostrado que os isolados testados suportavam tais condições em meio líquido.

Tabela 2. Valores das médias do índice de antibiose obtidos no ensaio da dupla-camada nas diferentes modificações do meio de cultivo ACA para os quinze isolados de *Streptomyces* frente aos micro-organismos *Candida sp.* e *E. coli*.

Isolados	Meio Amido-Caseína (ACA)									
	<i>Candida sp.</i>					<i>Escherichia coli</i>				
	Controle	CuSO ₄	FeSO ₄	MgSO ₄	NaCl	Controle	CuSO ₄	FeSO ₄	MgSO ₄	NaCl
2	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
4	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
5	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
9	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
11	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
12	11,71	X	-	-	-	-	X	-	-	-
16	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
19	-	X	5,10	-	-	-	X	-	-	-
22	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
30	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
33	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
34	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
39	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
41	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
43	1,87	X	1,61	-	-	-	X	-	-	-

X: sem crescimento bacteriano. -: sem atividade antimicrobiana

Meio Czapek-Dox

Os isolados de *Streptomyces* apresentaram atividade antimicrobiana no meio Czapek-Dox controle, assim como no meio ACA, apenas contra o isolado de *Candida* (Tabela 3). Novamente o isolado 12 apresentou um alto índice de antibiose (9,01), sendo o único isolado a apresentar atividade nesse meio de cultivo. Uma comparação entre os meios ACA e Czapek-Dox tende a indicar que o primeiro é mais eficiente para a produção de antimicrobiano pelo isolado 12 nas condições testadas.

Dentre as diferentes modificações do meio de cultivo, o meio Czapek-Dox apresentou resultados positivos com sulfato de magnésio (10 mM) e com cloreto de sódio (3,75%). No primeiro, o isolado 22 obteve um índice de antibiose de 1,57 frente ao isolado de *Candida*, resultado não obtido no controle. A adição de 3,75% de cloreto de sódio ao meio de cultivo resultou em atividade antimicrobiana frente ao isolado de *E. coli*. Neste meio, oito dos quinze isolados de *Streptomyces* apresentaram atividade microbiana, mas, diferente dos resultados anteriores, os halos formados não inibiram completamente o crescimento do micro-organismo, mas houve uma considerável diminuição no seu crescimento. Tais resultados indicam a produção de um provável composto bacteriostático. Dentre os oito isolados que apresentaram atividade (Tabela 3), destacam-se os isolados 16 e 33, que alcançaram valores de índice de antibiose de 8,09 e 11,20, respectivamente. A mudança no perfil de produção dos oito isolados frente à modificação no meio de cultura é muito promissora. Em relação aos resultados obtidos com a adição de sulfato de cobre ao meio Czapek-Dox, novamente, assim como no meio ACA, os isolados de *Streptomyces* foram incapazes de crescer com a adição dessa substância.

Oito isolados de *Streptomyces* apresentaram atividade antimicrobiana quando em meio Czapek-Dox com 3,75% de cloreto de sódio. Diferente dos resultados anteriores, os halos formados não inibiram completamente o crescimento do micro-organismo, porem foi possível observar uma considerável diminuição no seu crescimento.

Tabela 3. Valores das médias do índice de antibiose obtidos no ensaio da dupla-camada nas diferentes modificações do meio de cultivo Czapek para os quinze isolados de *Streptomyces* frente aos micro-organismos *Candida* sp. e *E. coli*.

Isolados	Meio Czapek-Dox									
	<i>Candida</i> sp.					<i>Escherichia coli</i>				
	Controle	CuSO ₄	FeSO ₄	MgSO ₄	NaCl	Controle	CuSO ₄	FeSO ₄	MgSO ₄	NaCl
2	-	X	-	-	-	-	X	-	-	7,54
4	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
5	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
9	-	X	-	-	-	-	X	-	-	6,25
11	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
12	9,01	X	-	-	-	-	X	-	-	-
16	-	X	-	-	-	-	X	-	-	8,09
19	-	X	-	-	-	-	X	-	-	6,69
22		X	-	1,57	-	-	X	-	-	6,26
30	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
33	-	X	-	-	-	-	X	-	-	11,20
34	-	X	-	-	-	-	X	-	-	5,08
39	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
41	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
43	-	X	-	-	-	-	X	-	-	7,35

X: sem crescimento do isolado de *Streptomyces*. -: sem atividade antimicrobiana.

Meio GYM

Os resultados do meio de cultivo GYM controle foram semelhantes aos do meio ACA. Novamente, os isolados 12 e 43 se mostraram capazes de inibir o crescimento do isolado de *Candida* (**Tabela 4**), com índices de antibiose de 6,66 e 2,04, respectivamente.

Neste meio de cultivo os isolados de *Streptomyces* apresentaram atividade antimicrobiana em todas as modificações propostas, exceto com a adição de cloreto de sódio 3,75%. Nas demais modificações, pelo menos um dos isolados foi capaz de inibir o crescimento microbiano. O isolado 12 apresentou atividade contra o isolado de *Candida* no meio GYM sulfato de ferro 1,25 mM (índice de 5,76) e no meio GYM sulfato de magnésio 10 mM (índice de 1,72). Comparando tais resultados ao controle, observa-se que o meio GYM sulfato de ferro 1,25 mM apresentou um valor (5,76 e 2,78 para os isolados 12 e 43, respectivamente) semelhante ao observado no meio sem modificação (6,66 e 2,04 para os isolados 12 e 43, respectivamente), enquanto que o meio GYM sulfato de magnésio 10 mM apresentou uma diminuição no índice de antibiose para o isolado de levedura (6,66 para 1,72). Ainda sobre o meio GYM sulfato de magnésio 10 mM, os isolados 4, 5 e 11 apresentaram atividade antimicrobiana contra o isolado de levedura, com índices de 1,17, 1,23 e 1,38, respectivamente. Esses resultados não foram observados no meio de cultivo controle. Ainda abordando os isolados que conseguiram

inibir o crescimento do isolado de *Candida*, foi observada atividade produzida pelo isolado 43 no meio GYM sulfato de ferro 1,25 mM (índice de 2,78) e no meio GYM sulfato de cobre 0,625 mM (índice de 2,51). Ambos os valores se mantiveram próximos aos valores do controle. Por último, o isolado 33 também foi capaz de inibir o crescimento do isolado de *Candida*, com índice de 2,97 observado no meio com sulfato de cobre 0,625 mM. Contra esse micro-organismo, o isolado 33 apresentou atividade antimicrobiana apenas com a adição de sulfato de cobre. Em relação aos isolados de bactérias, o único resultado positivo observado para o meio GYM foi com o isolado 22, que conseguiu diminuir o crescimento bacteriano do isolado de *E. coli*, com um índice de antibiose de 3,54. Esse resultado foi obtido com a adição de 10 mM de sulfato de magnésio ao meio de cultivo.

Tabela 4. Valores das médias do índice de antibiose obtidos no ensaio da dupla-camada nas diferentes modificações do meio de cultivo GYM para os quinze isolados de *Streptomyces* frente aos micro-organismos *Candida sp.* e *E. coli*.

Isolados	Meio GYM									
	<i>Candida spp.</i>					<i>Escherichia coli</i>				
	Controle	CuSO ₄	FeSO ₄	MgSO ₄	NaCl	Controle	CuSO ₄	FeSO ₄	MgSO ₄	NaCl
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	1,17	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	1,23	-	-0	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	1,38	-	-	-	-	-	-
12	6,66	-	5,76	1,72	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	3,54	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	2,97	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	2,04	2,51	2,78	2,43	-	-	-	-	-	-

X: sem crescimento do isolado de *Streptomyces*. -: sem atividade antimicrobiana

Em nenhum dos ensaios realizados para avaliar a produção de compostos antimicrobianos pelos isolados de *Streptomyces* foi observada atividade antimicrobiana contra a bactéria *K. pneumoniae*.

Discussão

A resistência contra agentes antimicrobianos tornou-se um grande problema de saúde. A falta de desenvolvimento de novos compostos (apenas duas novas classes de antibióticos introduzidas nas últimas quatro décadas) e o aumento de cepas multirresistentes pioram o cenário. Algumas estimativas apontam que no ano de 2050 a resistência a antimicrobianos terá causado cerca de 300 milhões de mortes, com perdas econômicas na casa das centenas de trilhões de dólares [26]. Os novos *insights*

sobre o uso de bactérias do solo como fonte de novos antibióticos abrem novas possibilidades para a procura por novos compostos. Um dos mecanismos propostos para angariar novos compostos se dá pela ativação de genes silenciados ou genes crípticos [27].

A busca por micro-organismos que habitam ambientes inóspitos tem o intuito de encontrar organismos com características metabólicas distintas, tais características forjadas ao longo do tempo pela evolução e adaptação a esses ambientes extremos [10, 28]. Trabalhos como o de Waithaka et al. [29], que isolou diversos isolados de actinobactérias com atividade antimicrobiana de uma cratera vulcânica no Quênia, e de Cheah et al. [10], que encontraram isolados de actinobactérias com atividade microbiana contra alguns patógenos em solo vulcânico em uma região da Antártica, indicam a importância em explorar locais com características ambientais mais extremas. Portanto, o potencial dos isolados de *Streptomyces* oriundos do solo antártico merece ser investigado quanto a sua capacidade antimicrobiana frente a isolados microbianos que apresentam resistência a alguns antimicrobianos.

Os resultados do ensaio da dupla-camada mostraram que, nos meios de cultivo controle, apenas os isolados 12 e 43 apresentaram atividade antimicrobiana (exceto no meio Czapek-Dox onde o isolado 43 não apresentou atividade), e tal atividade foi observada apenas contra o isolado de *Candida sp.* O isolado 12 teve o melhor índice de antibiose nos resultados com meio controle, atingindo uma média de 11,71 no meio ACA. Augustine *et al.* [30] avaliaram a capacidade de isolados de actinomicetos, provenientes de amostras de solo, em produzir compostos antifúngicos, em diversos meios de cultivo, frente a isolados de leveduras e fungos filamentosos. Dentre os diferentes meios utilizados, o ACA apresentou os melhores resultados para produção de compostos antifúngicos. Oliveira *et al.* [31], que avaliaram o potencial antifúngico de isolados de *Streptomyces* frente a fitopatógenos, observou que a maior atividade antimicrobiana foi obtida com o meio de cultivo ACA. Esses trabalhos apontam que o meio ACA é comumente o meio mais apropriado para produção de compostos antimicrobianos produzidos por isolados de actinobactérias provenientes de amostras de solo, corroborando com o resultado obtido pelo presente trabalho.

A mudança na composição e nas concentrações das substâncias presentes nos três meios de cultivo testados refletiu na atividade antimicrobiana dos isolados de *Streptomyces*. Enquanto que nos meios controle apenas dois isolados apresentaram atividade, nos ensaios com meio de cultivo modificado apenas os isolados 30, 39 e 41 não apresentaram nenhuma atividade contra os micro-organismos testados. É sabido que metais-traço, como os utilizados no presente trabalho em forma de sulfato, têm papel fundamental em diversos processos biológicos e reações enzimáticas [32]. O isolado 19 apresentou um índice de antibiose de 5,10 frente ao isolado de *Candida sp.* com a modificação da de sulfato de ferro ao meio ACA, atividade não observada no meio controle. Zhou *et al.* [33] observaram que a alteração da concentração dessa substância no meio de cultivo teve efeito negativo sobre um isolado de *Streptomyces* na produção do antibiótico *Nosiheptide*. Outros trabalhos demonstraram que condições de cultivo

ricas em ferro tendem a atuar como repressores na síntese de metabólitos secundários [34, 35]. Este efeito pode ter sido refletido nos resultados obtidos nesse trabalho, visto que o isolado 12 deixou de produzir o composto antimicrobiano contra o isolado de *Candida sp.* nos meios ACA e Czapek-Dox. Porém, tal alteração do meio de cultivo não parece ter interferido na produção de metabólito pelo isolado 43 e, o isolado 19 passou a inibir o crescimento da levedura.

Com a adição e modificação na concentração de sulfato de magnésio também se observou uma mudança do perfil de produção de compostos antimicrobianos, especialmente no meio de cultivo GYM. Os isolados 4, 5 e 11 apresentaram atividade contra o isolado de *Candida spp.*, além dos isolados 12 e 43 que também tiveram atividade no meio controle. Além da atividade antifúngica observada, essa alteração também demonstrou resultado positivo contra o isolado de *E. coli*. Zhou *et al.* [33] verificaram que o sulfato de magnésio aumentou significativamente a produção do antibiótico Nosiheptide. O íon Mg^{+2} possui um papel catalítico importante como cofator de enzimas envolvidas na estimulação da síntese de DNA e proteínas por meio dos metabólitos da glicose, o que pode explicar a grande mudança no perfil de produção no meio GYM, visto que esse meio contém um grande aporte desse carboidrato em sua composição.

Sabe-se que o cobre é um importante cofator de enzimas e proteínas transportadoras de elétrons. A disponibilidade desse íon no meio de cultivo tem papel importante no início da diferenciação morfológica e produção de metabólitos secundários no gênero *Streptomyces*. Com o sulfato de cobre, os isolados 33 e 43 apresentaram atividade contra o isolado de levedura, sendo que o último não variou muito do resultado obtido no controle. O efeito da adição de cobre ao meio de cultivo sobre a produção de compostos antimicrobianos é discutível. Mao *et al.* [36] observaram aumento significativo na produção de Candicinina por um isolado de *Streptomyces* ao adicionar sulfato de cobre ao meio, enquanto que no trabalho de Cruz-Morales *et al.* [37] identificaram e demonstraram a expressão de um *cluster* de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários responsivos ao cobre. Porém, outros estudos mostram que aumentar a disponibilidade de cobre, muitas vezes, acaba reprimindo a produção de antibióticos como a Actinorhodine e Nosiheptide [33, 38]. A adição de sulfato de cobre aos três meios de cultivo impediu que os isolados de *Streptomyces* fossem cultivados nos meios ACA e Czapek-Dox. Sabe-se que esse íon pode ser extremamente tóxico para as células e essa toxicidade pode ser a explicação para esse resultado nos meios ACA e Czapek-Dox. Uma possível explicação para o crescimento observado no meio GYM é a grande disponibilidade de fontes de carbono, o que poderia levar à sobrevivência dos isolados de *Streptomyces* em condições de altas concentrações de cobre.

Em relação à alteração da salinidade dos meios de cultivo testados, apenas no meio Czapek-Dox foi observado atividade antimicrobiana, porém, este pode ser considerado um dos resultados mais interessantes do trabalho. Na concentração de 3,75% de cloreto de sódio, oito dos quinze isolados de *Streptomyces* apresentaram atividade

antimicrobiana frente ao isolado de *E. coli*, sendo que não foi observado atividade em nenhum dos isolados nos testes com meio controle frente aos isolados bacterianos. Kathiresan *et al.* (2003) avaliaram a produção de um composto antifúngico produzido por isolados de *Streptomyces* frente a diferentes condições de salinidade e o resultado com maior atividade foi obtido em concentrações de 1,87% de sal, metade do valor obtido no presente trabalho [39]. Em trabalho semelhante, Vijayakumar *et al.* observaram que a salinidade ótima para a produção de antibióticos por um isolado de *Streptomyces* foi de 4% [40].

Conclusão

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de dupla-camada com os meios controle evidenciaram que dois isolados (12 e 43) foram capazes de produzir compostos antifúngicos que inibiram o crescimento de uma cepa de *Candida sp* nos três meios de cultivo testados. As diferentes modificações realizadas nas composições destes meios evidenciaram que a adição de metais-traço pode mudar o perfil de produção destes isolados, visto que apenas três isolados (30, 39 e 41) não apresentaram atividade antimicrobiana após a modificação dos meios de cultivo. O aumento da concentração de cloreto de sódio (3,75%) resultou em oito dos quinze isolados de *Streptomyces* apresentando atividade contra o isolado de *E. coli* no meio Czapek-Dox, visto que no meio controle, nenhum dos estreptomicetos havia inibido o crescimento bacteriano desse isolado. Os resultados obtidos a partir das modificações nos meios de cultivo são promissores e a busca por condições ótimas de cultivo merecem ser melhor avaliadas. Este trabalho corrobora com diversos estudos na literatura que apresentaram resultados semelhantes ao modificar a composição do meio de cultivo com metais-traço e alterações de salinidade. Existe a necessidade de mais testes para confirmar os resultados obtidos no trabalho, de forma que testes estatísticos possam dar mais confiabilidade aos nossos resultados. Além disso, a investigação das condições ótimas de cultivo para esses isolados é bastante promissora, assim como a caracterização dos compostos produzidos pelos isolados de *Streptomyces* oriundos do solo antártico.

Referências

1. Peyclit, L., et al., *Role of Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection in the surveillance of resistance to antibiotics and training of students in the Mediterranean basin and in African countries*. *New microbes and new infections*, 2018. **26**: p. S52-S64.
2. Organization, W.H., *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. 2014: World Health Organization.
3. O'Neill, J., *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*. 2016. HM Government and Wellcome Trust: UK, 2018.
4. de Kraker, M.E., A.J. Stewardson, and S. Harbarth, *Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?* *PLoS medicine*, 2016. **13**(11): p. e1002184.
5. Genilloud, O. and F. Vicente, *Novel Approaches to Exploit Natural Products from Microbial Resources*, in *Drug Discovery from Natural Products*. 2012, Royal Society of Chemistry. p. 221-248.
6. Boucher, H.W., et al., *10x'20 progress—development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America*. *Clinical infectious diseases*, 2013. **56**(12): p. 1685-1694.
7. Genilloud, O., *The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014. **106**(1): p. 173-188.
8. Dobson, C.M., *Chemical space and biology*. *Nature*, 2004. **432**(7019): p. 824.
9. Rosén, J., et al., *Novel chemical space exploration via natural products*. *Journal of medicinal chemistry*, 2009. **52**(7): p. 1953-1962.
10. Cheah, Y.-K., et al., *Isolation, identification and screening of Actinobacteria in volcanic soil of Deception Island (the Antarctic) for antimicrobial metabolites*. *Polish Polar Research*, 2015. **36**(1).
11. Dhanasekaran, D., et al., *Screening of salt pans actinomycetes for antibacterial agents*. *Internet J Microbiol*, 2005. **1**(2): p. 1-8.
12. Thakur, D., et al., *Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites*. *Journal de Mycologie Médicale*, 2007. **17**(4): p. 242-249.
13. Pathom-Aree, W., et al., *Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench*. *Extremophiles*, 2006. **10**(3): p. 181-189.
14. Baltz, R.H., *Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in Streptomyces and other actinomycetes*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2016. **43**(2-3): p. 343-370.
15. Ochi, K., Y. Tanaka, and S. Tojo, *Activating the expression of bacterial cryptic genes by rpoB mutations in RNA polymerase or by rare earth elements*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2014. **41**(2): p. 403-414.
16. Bode, H.B., et al., *Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity*. *ChemBioChem*, 2002. **3**(7): p. 619-627.
17. Hopwood, D.A., *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*. 2007: Oxford University Press.
18. de Lima Procópio, R.E., et al., *Antibiotics produced by Streptomyces*. *The Brazilian Journal of infectious diseases*, 2012. **16**(5): p. 466-471.
19. Flärdh, K., *Growth polarity and cell division in Streptomyces*. *Current opinion in microbiology*, 2003. **6**(6): p. 564-571.
20. Donachie, W.D., *The cell cycle of Escherichia coli*. *Annual Reviews in Microbiology*, 1993. **47**(1): p. 199-230.
21. Claessen, D., et al., *Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies*. *Nature Reviews Microbiology*, 2014. **12**(2): p. 115.
22. Solecka, J., et al., *Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes*, in *Open Life Sciences*. 2012. p. 373.

23. Abdelmohsen, U.R., et al., *Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes*. Biotechnol Adv, 2015. **33**(6 Pt 1): p. 798-811.
24. Bentley, S.D., et al., *Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3 (2)*. Nature, 2002. **417**(6885): p. 141.
25. de Oliveira, D.V., et al., *Genetic Background of β -Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates from Environmental Samples*. Microbial ecology, 2017. **74**(3): p. 599-607.
26. Munita, J.M. and C.A. Arias, *Mechanisms of antibiotic resistance*. Microbiology spectrum, 2016. **4**(2).
27. Terekhov, S., I. Osterman, and I. Smirnov, *High-Throughput Screening of Biodiversity for Antibiotic Discovery*. Acta naturae, 2018. **10**(3): p. 23.
28. Ballav, S., et al., *Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites*. Journal of bioscience and bioengineering, 2015. **119**(3): p. 323-330.
29. Waithaka, P., et al., *Isolation of Actinomycetes from Geothermal Vents of Menengai Crater in Kenya*. Int J Mol Biol Open Access, 2017. **2**(5): p. 00031.
30. Augustine, S., et al., *Isolation, characterization and optimization of antifungal activity of an actinomycete of soil origin*. 2004.
31. de Oliveira, M.F., M.G. da Silva, and S.T. Van Der Sand, *Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (Lycopersicon esculentum) in southern Brazil, and characterization of Streptomyces spp. R18 (6), a potential biocontrol agent*. Research in Microbiology, 2010. **161**(7): p. 565-572.
32. Locatelli, F.M., K.-S. Goo, and D. Ulanova, *Effects of trace metal ions on secondary metabolism and the morphological development of streptomycetes*. Metallomics, 2016. **8**(5): p. 469-480.
33. Zhou, W., et al., *Effect analysis of mineral salt concentrations on nosiheptide production by Streptomyces actuosus Z-10 using response surface methodology*. Molecules, 2014. **19**(10): p. 15507-15520.
34. Bechet, M. and R. Blondeau, *Iron deficiency-induced tetracycline production in submerged cultures by Streptomyces aureofaciens*. Journal of applied Microbiology, 1998. **84**(5): p. 889-894.
35. Patzer, S.I. and V. Braun, *Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of Streptomyces sp. ATCC 700974*. Journal of bacteriology, 2010. **192**(2): p. 426-435.
36. Mao, X., et al., *Effect of copper sulfate on biosynthesis of FR-008/Candididin complex production in Streptomyces sp.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011. **27**(9): p. 2033-2039.
37. Cruz-Morales, P., et al., *The genome sequence of Streptomyces lividans 66 reveals a novel tRNA-dependent peptide biosynthetic system within a metal-related genomic island*. Genome biology and evolution, 2013. **5**(6): p. 1165-1175.
38. Abbas, A.S. and C. Edwards, *Effects of metals on Streptomyces coelicolor growth and actinorhodin production*. Applied and environmental microbiology, 1990. **56**(3): p. 675-680.
39. Kathiresan, K., R. Balagurunathan, and M.M. Selvam, *Fungicidal activity of marine actinomycetes against phytopathogenic fungi*. 2005.
40. Vijayakumar, R., et al., *Optimization of antimicrobial production by a marine actinomycete Streptomyces afghaniensis VPTS3-1 isolated from Palk Strait, East Coast of India*. Indian journal of microbiology, 2012. **52**(2): p. 230-239.

4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A ascensão da resistência a antimicrobianos se tornou uma das grandes preocupações para a comunidade científica de todo o mundo, preocupação também compartilhada em um relatório divulgado pela Organização Mundial da Saúde evidenciando essa problemática por todo o globo. Devido a isso, a busca por novos compostos antimicrobianos com potencial para serem utilizados como antibióticos tem sido um dos grandes esforços da comunidade científica por todo o mundo. Uma das grandes fontes de drogas antimicrobianas é a produção de compostos naturais provindos de micro-organismos capazes de produzir tais compostos.

A avaliação do potencial de produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana por quinze isolados de *Streptomyces* provenientes de amostras de solo antártico foi realizada no presente trabalho, sendo que os ensaios foram realizados nos meios de cultivo ACA, Czapek e GYM, frente a isolados de *Candida spp.*, *E. coli* e *K. pneumoniae*. O ensaio da dupla-camada mostrou que dois isolados (12 e 43) apresentaram atividade frente a um isolado de *Candida spp.* resistente a cinco antifúngicos. Após determinar a concentração máxima tolerada pelos quinze isolados de *Streptomyces* frente às substâncias sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de magnésio e cloreto de sódio, as concentrações obtidas no ensaio foram aplicadas aos três meios de cultivo com o intuito de avaliar o efeito dessas modificações na produção de compostos antimicrobianos.

A alteração da composição dos meios de cultivo surtiu efeito na produção de compostos antimicrobianos visto que apenas os isolados 30, 39 e 41 não apresentaram qualquer atividade frente aos micro-organismos testados. Dentre as modificações testadas, a adição de 10 mM de sulfato de magnésio, especialmente no meio GYM, levou a grandes diferenças de produção de compostos quando comparadas ao controle. Os isolados 4, 5 e 11 passaram a inibir o crescimento da levedura, além dos isolados 12 e 43 que continuaram inibindo o crescimento da mesma. Somada a esses resultados, o isolado 22 passou a inibir o crescimento bacteriano da *E. coli*.

Destacando outro resultado muito importante, a mudança da salinidade do meio de cultivo Czapek parece ter alterado drasticamente a capacidade dos isolados de *Streptomyces* em produzir compostos antibacterianos, visto que oito dos quinze isolados conseguiram inibir o crescimento do isolado de *E. coli*, resultado que não foi observado no meio controle

Sabe-se que a modificação nas condições e na composição do meio de cultivo têm grande impacto no metabolismo de micro-organismos, muitas vezes levando a alterações no perfil de biossíntese de compostos de interesse. A presença de metais-traço e a salinidade do meio de cultivo possuem papel importante no metabolismo de micro-organismos, e a modificação de tais variáveis é vista como uma estratégia eficiente e barata para aumentar e até levar à produção de novos compostos produzidos por esses micro-organismos. O presente trabalho mostrou que alterações na concentração de metais-traço e na salinidade do meio de cultivo levou a diferenças

claras no perfil de produção de compostos antimicrobianos de quinze isolados de *Streptomyces* provenientes do solo antártico, mostrando a importância em buscar as melhores condições de cultivo para extrair o máximo da capacidade de produção desses micro-organismos.

Como perspectivas desse trabalho, é necessário que mais testes sejam realizados para que métodos estatísticos possam ser empregados. Também, a determinação das condições ótimas de cultivo para esses isolados deve ser obtida, assim como a caracterização dos compostos produzidos e a investigação das variações moleculares e genéticas que levam a essa mudança do perfil de produção de compostos.

5 REFERÊNCIAS

1. Peyclit L, Chanteloup A, Hadjadj L, Rolain J-M. Role of Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection in the surveillance of resistance to antibiotics and training of students in the Mediterranean basin and in African countries. *New microbes and new infections*. 2018;26:S52-S64.
2. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New microbes and new infections*. 2015;6:22-9.
3. Koulenti D, Song A, Ellingboe A, Abdul-Aziz MH, Harris P, Gavey E, et al. Infections by multidrug-resistant Gram-negative Bacteria: what's new in our arsenal and what's in the pipeline? *International journal of antimicrobial agents*. 2018.
4. Organization WH. Antimicrobial resistance: global report on surveillance: World Health Organization; 2014.
5. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016. HM Government and Wellcome Trust: UK. 2018.
6. de Kraker ME, Stewardson AJ, Harbarth S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS medicine*. 2016;13(11):e1002184.
7. Genilloud O, Vicente F. Novel Approaches to Exploit Natural Products from Microbial Resources. *Drug Discovery from Natural Products: Royal Society of Chemistry*; 2012. p. 221-48.
8. Boucher HW, Talbot GH, Benjamin Jr DK, Bradley J, Guidos RJ, Jones RN, et al. 10x'20 progress—development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*. 2013;56(12):1685-94.
9. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(1):71-109.
10. Genilloud O. The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014;106(1):173-88.
11. Dobson CM. Chemical space and biology. *Nature*. 2004;432(7019):824.
12. Rosén J, Gottfries J, Muresan S, Backlund A, Oprea TI. Novel chemical space exploration via natural products. *Journal of medicinal chemistry*. 2009;52(7):1953-62.
13. Ballav S, Kerkar S, Thomas S, Augustine N. Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2015;119(3):323-30.
14. Nediakova D, Naidenova M. Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. 2005.
15. Walsh CT, Fischbach MA. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(8):2469-93.
16. Corre C, Challis GL. New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Natural product reports*. 2009;26(8):977-86.
17. Satyanarayana T, Raghukumar C, Shivaji S. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current science*. 2005:78-90.
18. Cheah Y-K, Learn-Han L, Chieng C-YC, Wong V-LCM. Isolation, identification and screening of Actinobacteria in volcanic soil of Deception Island (the Antarctic) for antimicrobial metabolites. *Polish Polar Research*. 2015;36(1).
19. Dhanasekaran D, Rajakumar G, Sivamani P, Selvamani S, Panneerselvam A, Thajuddin N. Screening of salt pans actinomycetes for antibacterial agents. *Internet J Microbiol*. 2005;1(2):1-8.
20. Thakur D, Yadav A, Gogoi B, Bora T. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *Journal de Mycologie Médicale*. 2007;17(4):242-9.

21. Pathom-Aree W, Stach JE, Ward AC, Horikoshi K, Bull AT, Goodfellow M. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*. 2006;10(3):181-9.
22. Aigle B, Lautru S, Spitteller D, Dickschat JS, Challis GL, Leblond P, et al. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2014;41(2):251-63.
23. Baltz RH. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2016;43(2-3):343-70.
24. Ochi K, Tanaka Y, Tojo S. Activating the expression of bacterial cryptic genes by *rpoB* mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2014;41(2):403-14.
25. Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*. 2002;3(7):619-27.
26. Kawai K, Wang G, Okamoto S, Ochi K. The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS microbiology letters*. 2007;274(2):311-5.
27. Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Busse H-J, Trujillo ME, Kämpfer P, et al. Road map of the phylum Actinobacteria. *Bergey's manual® of systematic bacteriology*: Springer; 2012. p. 1-28.
28. Ventura M, Canchaya C, Fitzgerald GF, Gupta RS, van Sinderen D. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2007;91(4):351-72.
29. Mayfield C, Williams S, Ruddick S, Hatfield H. Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 1972;4(1):79-91.
30. Silva-Lacerda G, Santana R, Vicalvi-Costa M, Solidônio E, Sena K, Lima G, et al. Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. *Genet Mol Res*. 2015;15(1):1-12.
31. Goodfellow M, Williams S. Ecology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*. 1983;37(1):189-216.
32. Edwards C. Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1993;42(2-3):161-79.
33. Chaudhary HS, Yadav J, Shrivastava AR, Singh S, Singh AK, Gopalan N. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *J Adv Pharm Technol Res*. 2013;4(2):118-23.
34. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016;80(1):1-43.
35. Arasu MV, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*. 2009;19(1):22-8.
36. Cho SS, Choi YH, Simkhada JR, Mander P, Park DJ, Yoo JC. A newly isolated *Streptomyces* sp. CS392 producing three antimicrobial compounds. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2012;35(1-2):247-54.
37. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga A-M, Challis GL, Thomson N, James KD, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*. 2002;417(6885):141.
38. Abdelmohsen UR, Grkovic T, Balasubramanian S, Kamel MS, Quinn RJ, Hentschel U. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnol Adv*. 2015;33(6 Pt 1):798-811.
39. de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of infectious diseases*. 2012;16(5):466-71.

40. Flärdh K. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Current opinion in microbiology*. 2003;6(6):564-71.
41. Donachie WD. The cell cycle of *Escherichia coli*. *Annual Reviews in Microbiology*. 1993;47(1):199-230.
42. Claessen D, Rozen DE, Kuipers OP, Søggaard-Andersen L, Van Wezel GP. Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(2):115.
43. Wildermuth H, Hopwood D. Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*. 1970;60(1):51-9.
44. Elliot MA, Buttner MJ, Nodwell JR. Multicellular development in *Streptomyces*. *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation*. 2008:419-38.
45. Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology*. 2005;8(2):208-15.
46. van Wezel GP, McDowall KJ. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Natural product reports*. 2011;28(7):1311-33.
47. Williams S, Vickers J. Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. *Biology of actinomycetes*. 1988;88:265-70.
48. Aderem A. Systems biology: its practice and challenges. *Cell*. 2005;121(4):511-3.
49. Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS microbiology reviews*. 2010;34(2):171-98.
50. Hopwood DA. *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*: Oxford University Press; 2007.
51. Solecka J, Rajnisz A, Postek M, Zajko J, Kawecki R, Havlicek V, et al. N-acetyl-3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, a second identified bioactive metabolite produced by *Streptomyces* sp. 8812. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012;65(4):219-21.
52. Bervanakis G. *Detection and Expression of Biosynthetic Genes in Actinobacteria*: Flinders University, School of Medicine, Department of Medical Biotechnology.; 2008.
53. O'Brien J, Wright GD. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current opinion in biotechnology*. 2011;22(4):552-8.
54. Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Open Life Sciences* 2012. p. 373.
55. Milanezi A.C. ; Witusk, J. P. D. ; Van Der Sand, Sueli Teresinha. ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY OF YEASTS ISOLATED FROM ANTHROPOGENIC WATERSHED. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2018;V1:1-10.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CURRENT MICROBIOLOGY

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Original Papers, Review Papers, Letters, etc

OFFPRINTS

25 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=pltc_1818707_2/17

online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Materials and Methods

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

NEW: As of July 2017, all descriptions of novel Archaeal and Bacterial taxa must be accompanied by an entry in the Digital Protologue Database DPD ([Link](#)) and authors must include the respective Taxon Number in the text. For more information please read this editorial The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection belonging to the WDCM (e.g. DSM, ATCC, NCIMB; see the below [Link](#) for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable). The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section. Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the [Link](#) below).

For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the [Link](#) below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below [Link](#)) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable.

For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers.

For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

WDCM culture collections

NCBI Bio Project

HUPO proteomics standard initiative

American Society for Biochemistry and Molecular Biology guidelines

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

*The name(s) of the author(s) must be formatted as ‘full first name, middle initial, full last name’ or John W. Doe

*A concise and informative title

*The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

*The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

GENOME SEQUENCING DATA

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=plctci_1818707_3/17

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Authors are requested to provide full genome sequencing data along with their description of a new taxon. If it's not possible to obtain sequence data please give a short explanation on the reasons in your cover letter. Submissions without genome sequencing data will be evaluated on a case-by-case basis.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.

Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments and Funding Information

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full. In addition, please provide the funding information in a separate step of the submission process in the peer review system. Funder names should preferably be selected from the standardized list you will see during submission. If the funding institution you need is not listed, it can be entered as free text. Funding information will be published as searchable metadata for the accepted article, whereas acknowledgements are published within the paper.

SCIENTIFIC STYLE

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=plctci_1818707_4/17

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Genus and species names should be in italics.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.:

Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities

Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)

Bold for vectors, tensors, and matrices.

MANUSCRIPT LENGTH

1. The manuscript should not be longer than 12 pages, double spaced, including Figures and Tables. The 12-page limit does not include references.
2. The references should be listed alphabetically, then numbered.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738.
<https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

06/12/2018 *Current Microbiology* - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=plctci_1818707_5/17

EndNote style (zip, 2 kB)

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. *IOP Publishing PhysicsWeb*.
<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer’s LaTeX macro package.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=plctci_1818707_6/17

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=plctci_1818707_7/17

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=plctci_1818707_8/17

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles,

etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=plctci_1818707_9/17

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

MATERIALS AND METHODS

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

NEW: As of May 2017 all descriptions of novel Archaeal and Bacterial taxa must be accompanied by an entry in the Digital Protologue Database DPD ([Link/](#)) and authors must include the respective Taxon Number in the text. For more information please read this editorial/

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=plctci_1818707 10/17

The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection belonging to the WDCM (e.g. DSM, ATCC, NCIMB; see the below [Link](#) for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable). The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section. Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the [Link](#) below).

For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the [Link](#) below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below [Link](#)) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable. For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein Data Bank ([wwPDB](#))) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers.

For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

WDCM culture collections

NCBI Bio Project

HUPO proteomics standard initiative

American Society for Biochemistry and Molecular Biology guidelines

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review.

Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=pltcj_1818707 11/17

为便于编辑和评审专家准确评估您稿件中陈述的研究工作，您需要确保您的英语语言质量足以令人理解。如果您需要英文写作方面的帮助，您可以考虑：

- 请一位以英语为母语的同事审核您的稿件是否表意清晰。
- 查看一些有关英语写作中常见语言错误的教程。
- 使用专业语言编辑服务，编辑人员会对英语进行润色，以确保您的意思表达清晰，并识别需要您复核的问题。我们的附属机构Nature Research Editing Service 和合作伙伴American Journal Experts 即可提供此类服务。

教程

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

请注意，使用语言编辑服务并非在期刊上发表文章的必要条件，同时也并不意味或保证文章将被选中进行同行评议或被接受。

如果您的稿件被接受，在发表之前，我们的文字编辑会检查您的文稿拼写是否规范以及文体是否正式。

エディターと査読者があなたの論文を正しく評価するには、使用されている英語の質が十分に高いことが必要とされます。英語での論文執筆に際してサポートが必要な場合には、次のオプションがあります：

- ・ 英語を母国語とする同僚に、原稿で使用されている英語が明確であるかをチェックしてもらう。
- ・ 英語で執筆する際によくある間違いに関する英語のチュートリアルを参照する。
- ・ プロの英文校正サービスを利用する。校正者が原稿の意味を明確にしたり、問題点を指摘し、英語の質を向上させます。Nature Research Editing Service とAmerican Journal Experts の2つは弊社と提携しているサービスです。Springer の著者は、いずれのサービスも初めて利用する際には10%の割引を受けることができます。以下のリンクを参照ください。

英語のチュートリアル

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

英文校正サービスの利用は、投稿先のジャーナルに掲載されるための条件ではないこと、また論文審査や受理を保証するものではないことに留意してください。

原稿が受理されると、出版前に弊社のコピーエディターがスペルと体裁のチェックを行います。

영어원고의 경우, 에디터 및 리뷰어들이 귀하의 원고에 실린 결과물을 정확하게 평가할 수 있도록, 그들이 충분히 이해할 수 있을 만한 수준으로 작성되어야 합니다. 만약 영작문과 관련하여 도움을 받기를 원하신다면 다음의 사항들을 고려하여 주십시오:

- 귀하의 원고의 표현을 명확히 해 줄 영어 원어민 동료료를 찾아서 리뷰를 의뢰합니다.
- 영어 튜토리얼 페이지에 방문하여 영어로 글을 쓸 때 자주 하는 실수들을 확인합니다.
- 리뷰에 대비하여, 원고의 의미를 명확하게 해 주고 리뷰에서 요구하는 문제점들을 식별해서 영문 수준을 향상시켜 주는 전문 영문 교정 서비스를 이용합니다. Nature Research Editing Service 와 American Journal Experts 에서 저희와 협약을 통해서 서비스를 제공하고 있습니다. Springer 저자들이 본 교정 서비스를 첫 논문 투고를 위해 사용하시는 경우 10%의 할인이 적용되며, 아래의 링크를 통하여 확인이 가능합니다.

영어 튜토리얼 페이지

Nature Research Editing Service

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=pltcj_1818707 12/17

American Journal Experts

영문교정서비스는 게재를 위한 요구사항은 아니며, 해당 서비스의 이용이 피어리뷰에 논문이 선택되거나 게재가 수락되는 것을 의미하거나 보장하지 않습니다.

원고가 수락될 경우, 출판전저희측편집자에 의해 원고의 철자 및 문체를 검수하는 과정을 거치게 됩니다.

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Adding and/or deleting authors and/or changing the order of authors at revision stage may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the reason for the change(s) and the contribution role(s) of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=plctci_1818707 13/17

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is maintained on the platform, watermarked "retracted" and explanation for

the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=pltc1_1818707 14/17

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multipleaffiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

Ethical approval retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethical approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

2) Statement on the welfare of animals

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=plctci_1818707 15/17

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed."

If applicable (where such a committee exists): "All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted."

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

"This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors."

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: "Informed consent was obtained from all individual participants included in the study."

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

"Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying

information is included in this article.”

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection

06/12/2018 Current Microbiology - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/284?print_view=true&detailsPage=pltc_1818707 16/17

and dissemination of information under copyright laws.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Benefits:

Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.

Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.

Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons AttributionLicense.