

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**Avaliação da atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias
Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos.**

Tiele da Silva Carvalho

Porto Alegre, junho de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**Avaliação da atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias
Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos.**

Tiele da Silva Carvalho
Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Profª Drª Sueli T. Van Der Sand
Orientadora

Porto Alegre, junho de 2011

Este artigo foi elaborado segundo as normas do periódico *World Journal Microbiology and Biotechnology* apresentadas em anexo.

Avaliação da atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos.

Tiele da Silva Carvalho¹ & Sueli Teresinha Van Der Sand^{2*}.

1. Acadêmico de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia, Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Docente Orientador. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia, Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

*Correspondência: Sueli Teresinha Van Der Sand: svands@ufrgs.br; 3308-4505.

RESUMO

O uso indiscriminado de antibióticos tem sido um dos principais fatores pelo aumento de bactérias resistentes aos compostos hoje disponíveis no mercado. Devido a isso, a busca de novas moléculas com atividade antibiótica é de suma importância. A maioria dos antibióticos é de origem natural ou derivado desses. Os actinomicetos são os principais produtores naturais de compostos antimicrobianos, derivados do seu metabolismo secundário. O gênero *Streptomyces* é responsável por 90% dos antibióticos produzidos desde a descoberta do primeiro, em 1942, a estreptomicina. Os actinomicetos endofíticos, presentes em diversas espécies vegetais, são uma nova fonte promissora para a produção de compostos bioativos. Este estudo tem como objetivos avaliar a atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos, e verificar a influência de diferentes fontes de carbono e tempos de incubação na atividade dos actinomicetos. Para realização deste trabalho, foram utilizados dois actinomicetos isolados de tomateiro e treze isolados bacterianos Gram-negativos provenientes de água contaminada com esgoto. O actinomiceto R18(6) apresentou atividade contra todas as bactérias Gram-negativas no teste de dupla camada. Observou-se que o extrato bruto centrifugado foi mais eficiente do que os extratos brutos filtrados. Os extratos produzidos, durante sete dias de incubação, a partir de meios contendo glicerol ou glicose como fontes de carbono apresentaram melhor atividade antimicrobiana. O isolado R18(6), quando crescido em meio de cultura contendo

glicerol ou glicose, mostrou, após sete dias de crescimento, a capacidade de produzir metabólito(s) bioativo(s) contra os microrganismos testes.

Palavras-chave: Antimicrobianos; *Streptomyces*; Glicerol; Glicose; Centrifugação.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antibióticos tem-se tornado um motivo relevante para a descoberta de novos compostos, já que esse fato pode acarretar a seleção de microrganismos resistentes. A maioria dos antibióticos usados clinicamente é originada de produtos naturais microbianos ou são derivados destes (Clardy et al., 2006). Essa produção natural de compostos antimicrobianos de interesse clínico tem chamado a atenção da indústria farmacêutica.

Uma das principais fontes naturais de antibióticos é os actinomicetos. Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas pertencentes ao filo Actinobacteria, apresentam elevada concentração de bases guanina e citosina no seu DNA (*deoxyribonucleic acid*), e exibe uma grande variedade morfológica e metabólica (Nett et al., 2009). O principal habitat desse filo é o solo, representando mais de 30% da população de microrganismos, onde são responsáveis pela degradação e reciclagem de matéria orgânica (Kennedy, 1999). Sua variedade morfológica é representada pelas estratégias reprodutivas devido à formação de uma diversidade de esporos que são caracterizados de acordo com o gênero (Ensign, 1978). A versatilidade metabólica está nos produtos resultantes do metabolismo secundário: antifúngicos (Caffrey et al., 2008), antitumorais (Olano et al., 2009), imunossupressores (Graziani, 2009), enzimas extracelulares (Insam, 2001) e antibióticos (Waksman, 1953). O primeiro antibiótico derivado de actinomicetos foi descoberto em 1940, proveniente da espécie *Actinomyces antibioticus*. A actinomicina, como foi nomeado, mostrou-se ativa contra bactérias Gram-positivas, porém apresentou elevada toxicidade em experimentos com animais. Em 1942, foi descoberto um novo composto designado estreptotricina, originado da espécie *Actinomyces lavendulae*, que mostrou um amplo espectro de atividade e baixa toxicidade em animais (Waksman, 1953). Watve et al. (2001) estimaram que a ordem Actinomycetales produziu, aproximadamente, 3.000 antibióticos conhecidos desde 1942 e que 90% destes foram originados do gênero *Streptomyces*.

Uma nova fonte de compostos bioativos com potencial atividade antimicrobiana é o grupo dos actinomicetos endofíticos. Eles são importantes produtores de metabólitos secundários

como enzimas e antibióticos (Tian et al., 2004). Essas bactérias estão presentes dentro de tecidos vegetais saudáveis (Castillo, 2006), também podem ser isoladas de superfícies desinfetadas e não são patogênicas para a planta (Hallmann, 1997). Algumas espécies desse grupo já foram isoladas de tomate, banana, trigo e milho (Verma et al., 2009).

Este estudo tem como objetivos avaliar a atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias Gram-negativas com perfil de resistência a β -lactâmicos, isoladas de água contaminada com esgoto, e verificar a influência de diferentes fontes de carbono e tempo de incubação do actinomiceto em sua atividade.

MATERIAL E MÉTODOS

Local da Pesquisa

Este estudo foi realizado no Laboratório 164 do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da UFRGS.

Isolados de Actinomicetos

Para realização deste trabalho, foram utilizados dois actinomicetos endofíticos isolados de tomateiro (Tabela 1) pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da UFRGS. A coleta, o isolamento e a identificação das amostras por meio de provas morfológicas, bioquímicas e moleculares foram realizadas por Oliveira (2009). Os isolados de actinomicetos estavam conservados em tubos de ensaio contendo meio inclinado Ágar Tripton de Soja (TSA - “Tryptic Soy Agar”) a 4 °C.

Tabela 1. Actinomicetos endofíticos utilizados no estudo

Actinomiceto	Código
<i>Streptomyces</i> sp.	R(2)
<i>Streptomyces</i> sp.	R18(6)

Isolados Gram-negativos

Os treze isolados Gram-negativos utilizados neste estudo (Tabela 2) pertencem à bacterioteca do laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da UFRGS. Os microrganismos são provenientes de amostras de água contaminada com esgoto, e os mesmos

foram isolados e identificados por meio de provas morfológicas, bioquímicas e moleculares realizadas por Oliveira (2011). Esses microrganismos foram escolhidos devido ao seu perfil de resistência aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos. Os isolados Gram-negativos estavam conservados em glicerol 20% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para recuperação das células, uma alíquota foi retirada com a alça de platina, inoculada em Caldo Triptona de Soja (TSB - “Tryptic Soy Broth”) e incubada durante 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 2. Bactérias Gram-negativas, resistentes a beta-lactâmicos, utilizadas no estudo

Bactéria Gram negativa	Código	Resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos ¹	Gene de resistência
<i>Enterobacter intermedium</i>	1CC07	AMC, AMP, CFL, CFO, CRO	<i>bla</i> _{TEM}
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1CE02	AMP	<i>bla</i> _{SHV}
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2BS08	AMP	<i>bla</i> _{SHV}
<i>Escherichia coli</i>	2CC12	AMP, CFL	<i>bla</i> _{TEM}
<i>Escherichia coli</i>	4EE02	AMP, CFL	<i>bla</i> _{TEM}
<i>Escherichia coli</i>	4DE05	AMC, AM, CFL, CFO	<i>bla</i> _{TEM}
<i>Escherichia coli</i>	4DC04	AMP, CFL, CFO	<i>bla</i> _{TEM}
<i>Escherichia coli</i>	4EC05	AMC, AMP, CFL	<i>bla</i> _{TEM}
<i>Escherichia adecarboxylata</i>	4CE06	AMC, AMP, CFL, CFO	<i>bla</i> _{TEM}
<i>Hafnia alvei</i>	2AC02	CFL	<i>bla</i> _{SHV}
<i>Citrobacter diversus</i>	3CC04	AMP, CFL	<i>bla</i> _{TEM}
<i>Citrobacter diversus</i>	3EC04	AMP	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{SHV}
<i>Proteus mirabilis</i>	3DC01	AMC, AMP, CFL	<i>bla</i> _{SHV}

¹Antimicrobianos beta-lactâmicos testados: AMC: amoxicilica + ácido clavulânico; AMP: ampicilina; CFL: cefalotina; CFO: cefoxitina; CRO: ceftriaxona.

Técnica de dupla camada

Para avaliação inicial do potencial de produção de composto(s) bioativo(s) dos dois isolados de actinomicetos, contra os microrganismos testes, foi utilizada a técnica de dupla camada. Os actinomicetos foram inoculados, pelo método de picada, em placa de Petri contendo meio Ágar Amido Caseína (ACA) (amido 1%; caseína 0,012% ; NaCl 0,2% ; KNO₃ 0,2%; K₂HPO₄ 0,2%; MgSO₄ 0,005%; FeSO₄ 0,001%; CaCO₃ 0,002%; ágar bacteriológico 0,6%). Os actinomicetos foram incubados durante 14 dias a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o período de incubação, foram vertidas, sobre os crescimentos, suspensões contendo 1 mL da concentração de 10^8 células da bactéria teste/mL (o que correspondeu a uma solução padrão de 0,5 na escala McFarland), e 9 mL de Ágar Müller-Hinton fundido. As placas foram incubadas durante 24 h/48 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir da medição dos halos de inibição, foi determinada a atividade antimicrobiana quantitativa dos isolados de actinomicetos contra as bactérias Gram-negativas.

Produção do extrato bruto

Para produção do extrato bruto, os actinomicetos foram crescidos em Erlenmeyers contendo 50 mL de caldo Amido Caseína (AC) (amido 1%; caseína 0,012% ; NaCl 0,2% ; KNO₃ 0,2%; K₂HPO₄ 0,2%; MgSO₄ 0,005%; FeSO₄ 0,001%; CaCO₃ 0,002%;). O pré-inóculo para cada isolado foi incubado durante 48 h a 30 °C sob agitação. Após o período de incubação, 5 mL do cultivo foi transferido para um novo frasco contendo o meio AC e incubado durante 7 dias a 30 °C sob agitação. Após esse período, as amostras foram submetidas à filtração, com membranas filtrantes de 0,22 µm e de 0,45 µm de porosidade, e à centrifugação, a 13.000 r.p.m. durante 10 min, para obtenção de extrato bruto livre de células. O extrato bruto resultante foi empregado na técnica de difusão em poço.

Técnica de difusão em poço

A técnica de difusão em poço consistiu em inocular, utilizando *swab* estéril, uma suspensão de células na concentração de 10⁸ células de bactéria teste/mL sobre uma placa contendo ágar Müller Hinton. Após a semeadura, foram realizados poços equidistantes no ágar utilizando cilindros metálicos de 9 mm de diâmetro. Em cada poço, foram adicionados 100 µL do extrato bruto do isolado que apresentou atividade antimicrobiana positiva no teste de dupla camada. Primeiramente, a placa foi incubada por 16 h a 4 °C para difusão do extrato no meio de cultura. Posteriormente, a placa foi incubada por 48 h a 37 °C. A partir dessa técnica, foi analisada quantitativamente a atividade antimicrobiana de cada isolado e determinado qual método, filtração ou centrifugação, seria o mais adequado para obtenção de extrato bruto com atividade antimicrobiana.

Avaliação da atividade antimicrobiana em diferentes fontes de carbono e tempos de incubação

A avaliação da atividade antimicrobiana, em diferentes fontes de carbono e tempos de incubação, foi realizada com o isolado de actinomiceto que, nos testes de dupla camada e de difusão em poço, apresentou a melhor atividade antibiótica. O actinomiceto foi inoculado em 50 mL de meio base (caseína 0,03%; NaCl 0,2%; K₂HPO₄ 0,2%; MgSO₄ 0,005%; FeSO₄ 0,001%; CaCO₃ 0,002%; KNO₃ 0,2%) no qual foram adicionadas, individualmente, três fontes de carbono na concentração de 1% (sacarose, glicose e glicerol). O actinomiceto também foi inoculado em 50 mL de meio Bennett's (extrato de carne 0,1%; glicose 1%; peptona 0,2%; extrato de levedura 0,1%) e em 50 mL de meio AC. Um pré-inóculo foi preparado, para cada meio, inoculando-se o isolado durante 48 h a 30 °C sob agitação. Após

esse período, 5 mL do cultivo foi transferido para um novo frasco contendo o mesmo meio. A produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana foi avaliada em 7, 10 e 14 dias, sob agitação. Após cada período de incubação, foram retiradas alíquotas de 5 mL de cada meio e distribuídas em microtubos para centrifugação. As amostras foram centrifugadas a 13.000 r.p.m. durante 10 min. A avaliação quantitativa da produção de metabólito(s) secundário(s) foi realizada por meio da técnica de difusão em poço, utilizando 100 µL do sobrenadante, com medição dos halos de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos isolados de actinomicetos endofíticos foi avaliada quantitativamente pelo método de dupla camada. Apenas o isolado R18(6) mostrou-se eficaz contra as bactérias Gram-negativas, apresentando halos de inibição entre 11 a 27 mm (Tabela 3).

As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos e fosfolipídeos (Hancock, 1997). Uma das principais funções dessa membrana é agir como barreira de permeabilidade (Nikaido, 2003). Dessa forma, como houve inibição do crescimento das bactérias Gram-negativas, significa que a molécula produzida pelo isolado R18(6) foi capaz de permear a membrana externa. Os compostos antimicrobianos que passam a membrana externa podem agir como desestabilizadores, ligando-se os componentes estruturais da membrana, tornando-a mais permeável ou desestabilizando-a a ponto de rompê-la, como uma forma de atividade. As moléculas também podem ultrapassar a membrana externa através de porinas ou canais presentes nessa membrana (Hancock, 1997), agindo no interior da célula bacteriana.

Tabela 3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos actinomicetos endofíticos pela técnica de dupla camada

Isolado Gram-negativo	Actinomicetos Endofíticos – Zona de inibição (mm)	
	R18(6)	R(2)
1CC07	11	0
1CE02	19	0
2BS08	14,5	0
2CC12	24	0
4EE02	15,5	0
4DE05	17,5	0
4DC04	19	0
4EC05	20,5	0
4CE06	21,5	0
2AC02	14,5	0
3CC04	17	0
3EC04	26,5	0
3DC01	11	0

Segundo o estudo de Oliveira (2011), os isolados testados, no presente trabalho, apresentam gene de resistência aos β -lactâmicos – *bla*_{TEM} e/ou *bla*_{SHV} – sugerindo que o(s) metabólito(s) secundário(s) produzido(s) pelo actinomiceto endofítico R18(6) não apresenta(m) a estrutura do anel β -lactâmico que seria clivada pelas enzimas β -lactamases produzidas por essas bactérias.

Na técnica de difusão em poço, foi testada quantitativamente a atividade antibiótica do actinomiceto endofítico R18(6). Os extratos brutos, após crescimento de sete dias, foram submetidos à filtração, com membranas de 0,22 μ m e de 0,45 μ m, e à centrifugação. Apenas o extrato bruto centrifugado apresentou atividade contra os isolados Gram-negativos (Tabela 4). A filtração pode não ter sido eficiente, pois a(s) molécula(s) presente(s) no extrato podem ter afinidade com a membrana ficando retida(s). Nesse ensaio, dois isolados de *Escherichia* sp. não apresentaram a capacidade de crescer na presença do(s) metabólito(s). Para verificação da influência na atividade do actinomiceto, o meio AC foi novamente utilizado nos ensaios utilizando diferentes fontes de carbono.

Tabela 4. Avaliação da atividade antimicrobiana do actinomiceto e determinação do método de produção do extrato bruto empregando-se a técnica de difusão em poço

Isolado Gram-negativo	Método		
	Filtração Membrana 0,22µm	Filtração Membrana 0,45µm	Centrifugação
1CC07	0	0	0
1CE02	0	0	0
2BS08	0	0	0
2CC12	0	0	0
4EE02	0	0	0
4DE05	0	0	0
4DC04	0	0	0
4EC05	0	0	6
4CE06	0	0	15
2AC02	0	0	0
3CC04	0	0	0
3EC04	0	0	0
3DC01	0	0	0

Diâmetro dos halos de inibição (mm)

A capacidade de produzir metabólito(s) secundário(s) foi avaliada sob diferentes fontes de carbono e diferentes tempos de incubação. A avaliação foi realizada em duplicata e os resultados estão expressos como médias entre os testes. O isolado R18(6) cresceu em todos os meios testados, mas o(s) metabólito(s) com ação antimicrobiana só foram detectado nos meios contendo glicerol, glicose e sacarose, e no meio AC. Os meios mais eficientes na produção de metabólito(s) foram os contendo glicerol ou glicose como fonte de carbono. O meio AC foi novamente utilizado para verificar sua influência como fonte de carbono na atividade antimicrobiana do actinomiceto, pois no teste de produção de extrato bruto apenas dois isolados Gram-negativos foram inibidos pelo extrato produzido nesse meio. Oliveira (2009), em estudo com o mesmo actinomiceto endofítico, observou que o melhor meio para a produção de metabólitos foi o AC. Takur et al. (2009) observaram que o meio contendo glicerol era satisfatório para o crescimento e para a produção de antibióticos por *Streptomyces* sp. Baños et al. (2009) apontaram que a produção de ácido clavulânico pela espécie *Streptomyces clavuligerus* era favorecida em meio contendo glicerol. Aharonowitz & Demain (1978) observaram que o meio contendo glicerol permitia o crescimento do actinomiceto *Streptomyces clavuligerus*, porém interfere na produção de cefalosporina. Sathi et al. (2001) relataram que o meio contendo sacarose foi o melhor para a produção de metabólitos secundários por actinomicetos. Sanchz & Demain (2002) afirmaram que a glicose era uma excelente fonte de carbono para o crescimento celular e tem influência na produção de

diversos antibióticos. Takur et al. (2009) constataram também que o crescimento celular não está relacionado com a produção de metabólitos secundários. Então, um meio pode favorecer o crescimento do microrganismo, mas a produção de compostos bioativos pode não ser significativa.

Foi determinada também a influência do tempo de incubação na atividade antimicrobiana do actinomiceto e observou-se que o extrato produzido com sete dias de incubação apresentou melhor atividade antimicrobiana (Figura 1 e 2). Al-Zahrani (2007) encontrou melhor atividade antibiótica com o período de incubação de seis dias para o *Streptomyces* sp.

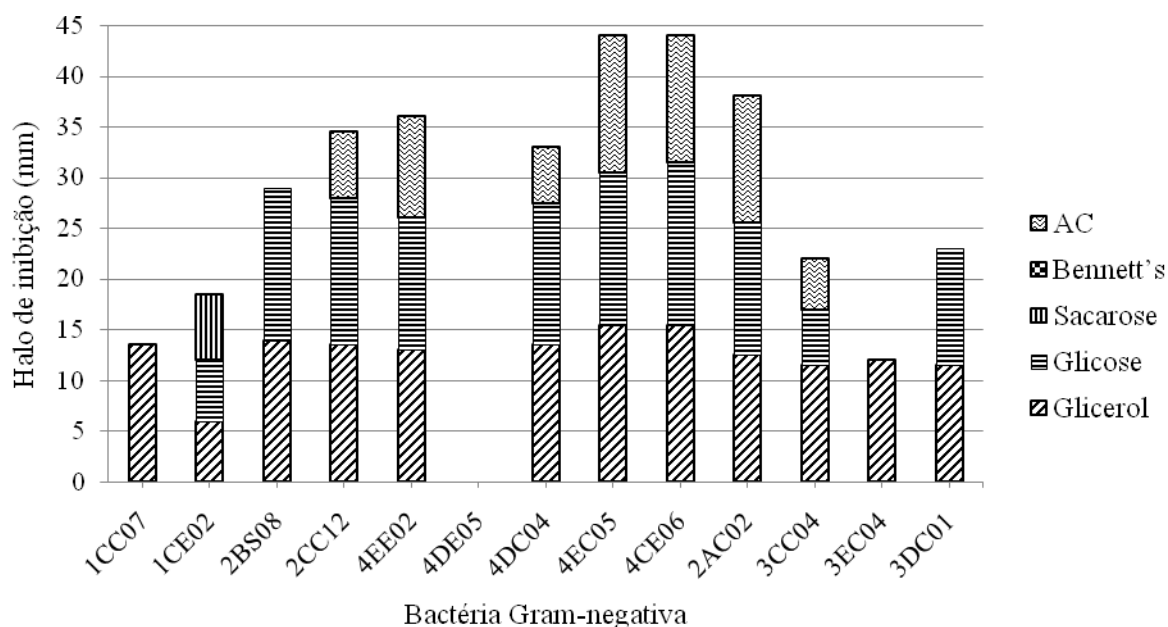


Figura 1. Avaliação da atividade antimicrobiana do R18(6) em diferentes fontes de carbono, pela técnica de difusão em poço, após 7 dias de incubação.

Observou-se que a atividade antimicrobiana foi diminuindo conforme os dias de incubação aumentavam: com sete dias de incubação, o extrato teve atividade antibiótica contra 12 isolados Gram-negativos (Figura 1); com 10 dias, a atividade foi contra 9 das bactérias Gram-negativas (Figura 2); e com 14 dias, não houve atividade contra os isolados Gram-negativos.

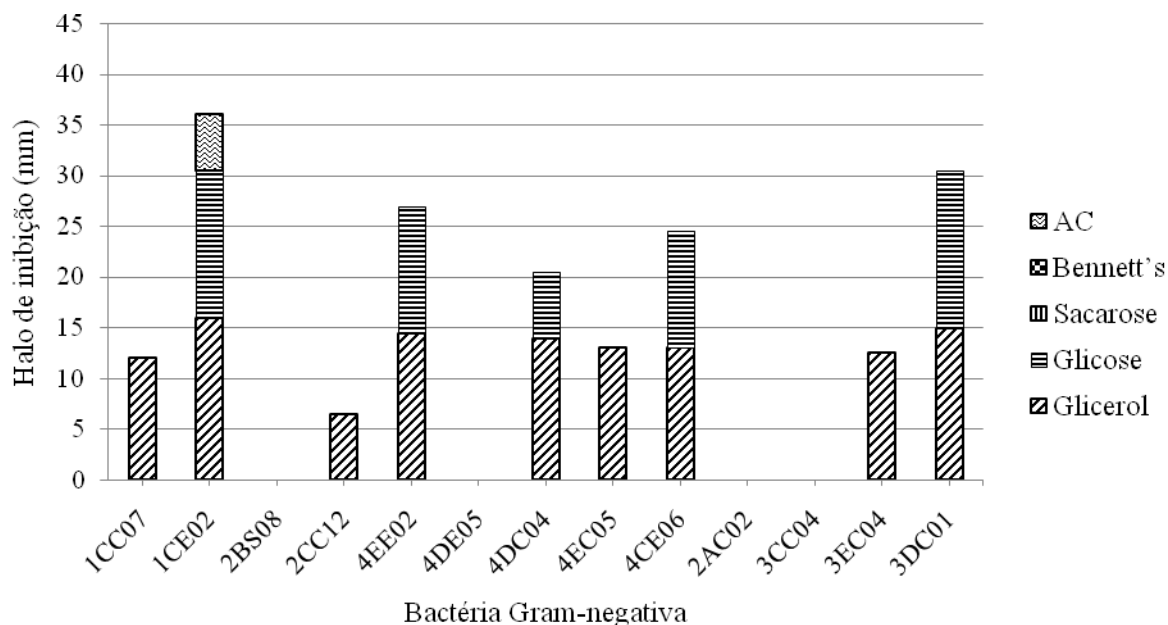


Figura 2. Avaliação da atividade antimicrobiana do R18(6) em diferentes fontes de carbono, pela técnica de difusão em poço, após 10 dias de incubação.

Durante os testes, observou-se que houve uma maior atividade, representada por halos de inibição maiores, quando o actinomiceto endofítico R18(6) foi inoculado em meio sólido comparado com a inoculação em meio líquido (Figura 3). Takur et al. (2007) relataram que os actinomicetos com atividade antimicrobiana em meio sólido tiveram a diminuição da atividade em meio líquido. Badji et al. (2005) observaram crescimento dos actinomicetos em meio líquido, mas sem produção de substâncias ativas comparada ao meio sólido. Iwai & Omura (1982) constataram que a diminuição da atividade do actinomiceto em meio líquido pode ser resultado da decomposição do antibiótico no meio e que também pode ocorrer danos celulares durante o processo de agitação, interferindo na atividade.

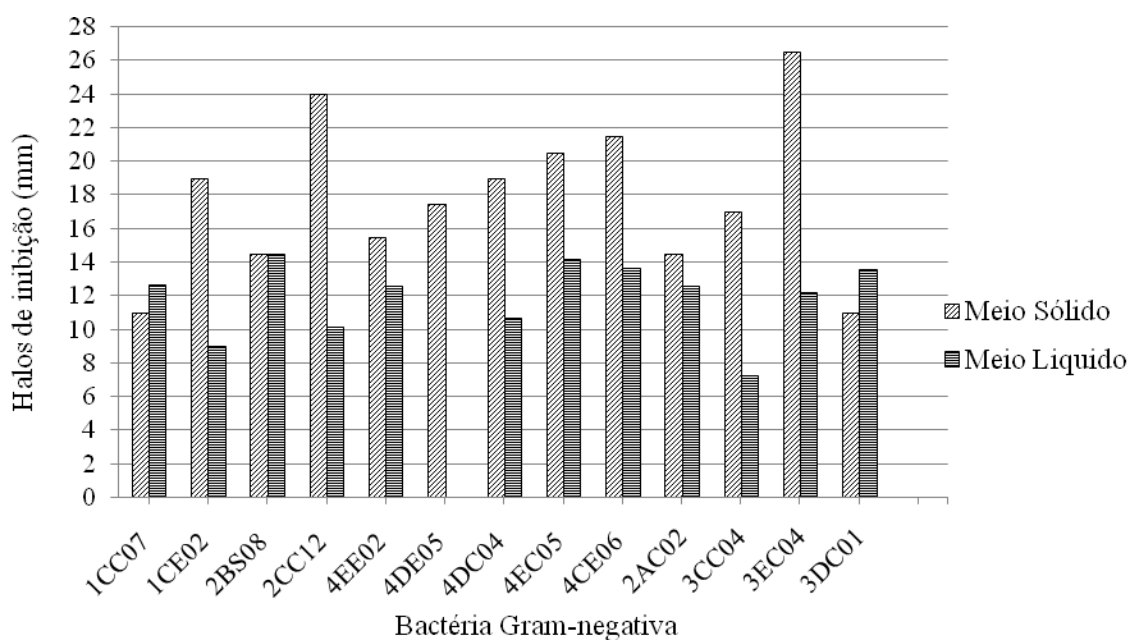


Figura 3. Comparação da atividade antimicrobiana do actinomiceto endofítico R18(6) em meio sólido e em meio líquido.

Nos halos de inibição formados, em todos os tempos de incubação, apareceram algumas colônias satélites, que pode ser resultado de uma baixa concentração do metabólito no extrato.

Oliveira (2009), em uma caracterização preliminar do isolado R18(6), observou que este é similar à espécie *Streptomyces pluricologrescens* e, sobre essa espécie, pouco foi encontrado na literatura que se relacionasse com a produção de compostos bioativos.

CONCLUSÃO

O actinomiceto R18(6) apresenta potencial para a produção de metabólito(s) ativo(s) contra bactérias Gram-negativas. A biossíntese do(s) composto(s) antimicrobiano(s) por esse actinomiceto é influenciada pela constituição do meio de cultura e pelo período de incubação do actinomiceto. O meio de cultura contendo glicerol ou glicose e o tempo de incubação de sete dias favorecem a atividade antimicrobiana do actinomiceto R18(6).

REFERÊNCIAS

- AHARONOWITZ, Y & DEMAINE, A. **Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus***. *Antimicrob Agents Chemother.* 14 (2): 159 – 164, 1978.
- AL-ZAHRANI, S.H.M. **Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from Jazan**. *JKAU.* 19: 127 – 138, 2007.
- BADJI, B.; RIBA, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A. & SABAOU, N. **Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes**. *Journal de Mycologie Médicale.* 15: 211 – 219, 2005.
- BAÑOS, S.; PÉREZ-REDONDO, R; KOEKMAN, B & LIRAS, P. **Glycerol utilization gene cluster in *Streptomyces clavuligerus***. *Appl Environ Microbiol.* 75(9): 2991 – 2995, 2009.
- CAFFREY, P.; APARICIO, J.F.; MALPARTIDA, F. & ZOTCHEV, S.B. **Biosynthetic engineering of polyene macrolides towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents**. *Curr Top Med Chem.* 8: 639 – 653, 2008.
- CASTILLO, U.F.; BROWNE, L.; STROBEL, G.; HESS, W.M.; EZRA, S.; PACHECO, G. & EZRA, D. **Biologically active endophytic streptomycetes from *Nothofagus* spp. and other plants in patagonia**. *Microb Ecol.* 53: 12 – 19, 2007.
- CLARDY, J.; FISCHBACH, M.A. & WALSH, C.T. **New antibiotics from bacterial natural products**. *Nat Biotechnol.* 24 (12): 1541 – 1550, 2006.
- ENSIGN, J.C. **Formation, properties and germination os actinomycete spores**. *Annu Rev Microbiol.* 32: 185 – 219, 1978.
- GRAZIANI, E.I. **Recent advances in the chemistry, biosynthesis and pharmacology of rapamycin analogs**. *Nat Prod Rep.* 26: 602 – 609, 2009.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F. & KLOEPPER, J.W. **Bacterial endophytes in agricultural crops**. *Can. J. Microbiol.* 43: 895 – 914, 1997.
- HANCOCK, R.E.W. **The bacterial outer membrane as a drug barrier**. *Trends Microbiol.* 5(1): 37 – 42, 1997
- INSAM, H. **Developments in soil microbiology since the mid 1960s**. *Geoderma.* 100: 389 – 402, 2001.

- IWAI, Y. & OMURA, S. **Culture conditions for screening of new antibiotics.** *J Antibiot.* 35(2): 123 – 141, 1982.
- KENNEDY, A.C. **Bacterial diversity in agroecosystems.** *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 74: 65 – 76, 1999
- NETT, M.; IKEDA, H. & MOORE, B. S. **Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes.** *Nat Prod Rep.* 26(11): 1362 – 1384, 2009.
- NIKAIDO H. **Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 67 (4): 593 – 656, 2003.
- OLANO, C.; MENDEZ, C.M. & SALAS, J.A. **Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis.** *Nat Prod Rep.* 26: 628 – 660, 2009.
- OLIVEIRA, D.V. de. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactéria Gram-negativas isoladas nas águas do Arroio Dilúvio.** 2011. 83 p. Monografia (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- OLIVEIRA, M.F. **Prospecção de actinomicetos endofíticos de tomateiro com produção de metabólitos bioativos e sua otimização.** 2009. 147 p. Artigos (Tese de Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- SANCHEZ, S.; DEMAIN, A.L. **Metabolic regulation of fermentation processes.** *Enzyme Microb Technol.* 31: 895 – 906, 2002.
- SATHI. Z.S; RAHMAN, M.A.A & GAFUR, M.A. **Identification and *in vitro* antimicrobial activity of a compound isolated from *Streptomyces* species.** *Pak J Biol Sci.* 4(12): 1523 – 1525, 2001.
- TAKUR, D.; BORA, T.C.; BORDOLOI, G.N. & MAZUMDAR, S. **Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201.** *J Med Myc.* 19 (3): 161 – 167, 2009.
- TAKUR, D.; YADAV, A.; GOGOI, B.K. & BORA, T.C. **Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites.** *J Med Myc.* 17: 242 – 249, 2007.
- TIAN, X.L.; CAO, L.X.; TAN, H.M.; ZENG, Q.G.; JIA, Y.Y.; HAN, W.Q. & ZHOU, S.N. **Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice**

and their antipathogenic activities *in vitro*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 20: 303 – 309, 2004.

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R.N. & GANGE, A.C. **Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity.** *Microb Ecol*. 57: 749 – 756, 2009.

WAKSMAN, S.A. **Streptomycin: background, isolation, properties and utilization.** *Science*. 118: 259 – 266, 1953.

WATVE, M.G. et al. **How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?** *Arch Microbiol*. 176: 386 – 390, 2001.

Anexo: Normas do periódico *World Journal Microbiology and Biotechnology*



World Journal of Microbiology and Biotechnology

Editor-in-Chief: Peter J. Large

ISSN: 0959-3993 (print version)

ISSN: 1573-0972 (electronic version)

Journal no. 11274

Instructions for Authors

Instructions for Authors

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 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

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- 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.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- 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.
Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
- Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

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

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

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.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

▫ 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. doi: 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*. doi:10.1007/s001090000086

▫ Book

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

▫ Book chapter

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

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

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

EndNote style (zip, 3 kB)

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

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

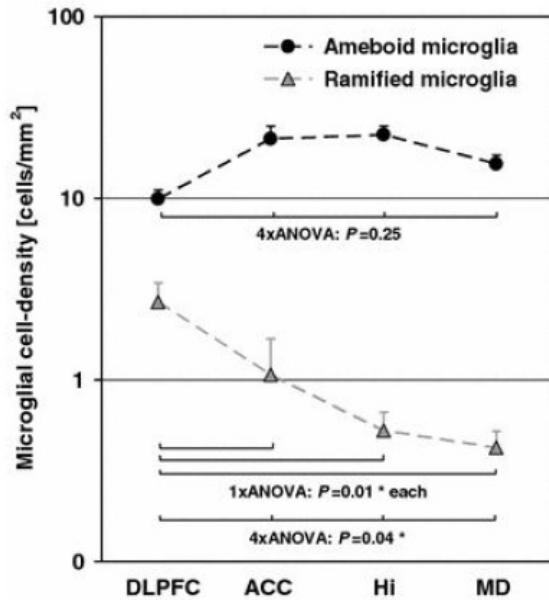
Electronic Figure Submission

- 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. MS Office 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.

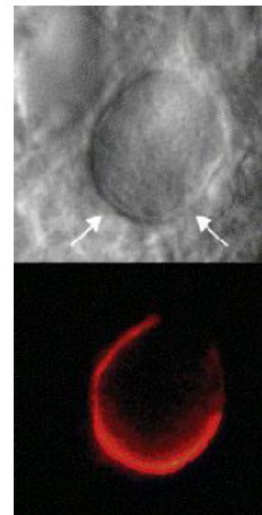
Line Art



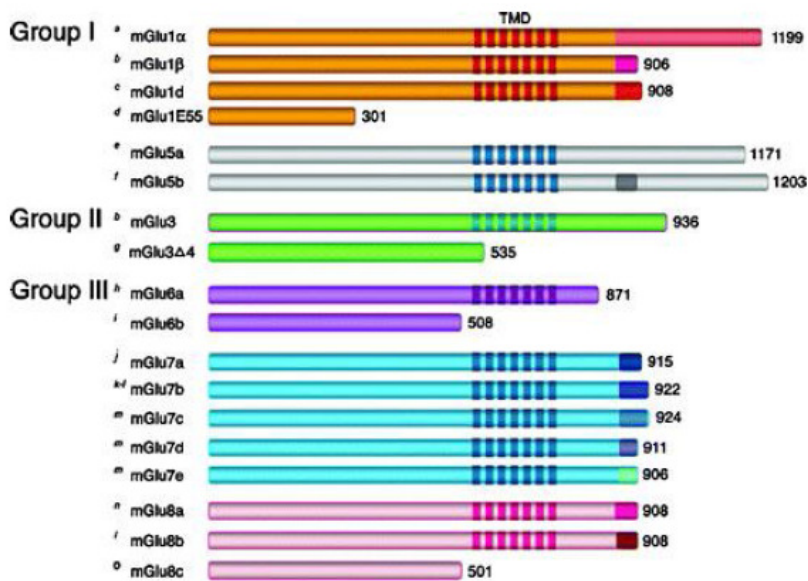
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should 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



- 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

- 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

- 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 (color-blind 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.

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

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

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 converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls 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)

ETHICAL STANDARDS

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

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

CONFLICT OF INTEREST

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

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.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Springer Open Choice

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 and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

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.