



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

ARIEL DE FIGUEIREDO NOGUEIRA MESQUITA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DO INTESTINO
DE CAMARÕES (*Penaeus vannamei*) CULTIVADOS COM POTENCIAL
ANTIMICROBIANO CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

FORTALEZA

2025

ARIEL DE FIGUEIREDO NOGUEIRA MESQUITA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DO INTESTINO DE
CAMARÕES (*Penaeus vannamei*) CULTIVADOS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO
CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.

Coorientador: Profa. Dra. Claudia Miranda Martins

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M543i Mesquita, Ariel de Figueiredo Nogueira.
Isolamento e caracterização de actinobactérias do intestino de camarões (*Penaeus vannamei*) cultivados com potencial antimicrobiano contra bactérias patogênicas / Ariel de Figueiredo Nogueira Mesquita. – 2025.
79 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.
Coorientação: Profa. Dra. Claudia Miranda Martins.
1. Streptomyces. 2. Resistência a antimicrobianos. 3. Isolamento de actinobactérias. 4. Microbiota. I. Título.

CDD 660.6

ARIEL DE FIGUEIREDO NOGUEIRA MESQUITA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DO INTESTINO DE
CAMARÕES (*Penaeus vannamei*) CULTIVADOS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO
CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: 25/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, por continuar sendo exemplo de ensino, pesquisa e extensão e por ter me acolhido em mais essa etapa de minha formação;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa que me permitiu focar nos estudos e na pesquisa ao longo do mestrado, e à FUNCAP pelo apoio financeiro ao laboratório;

Ao Prof. Bartolomeu de Souza, que aceitou me orientar mesmo diante de um projeto tão diferente e fora da sua zona de conforto. Não poderia ter achado um orientador mais parceiro e disposto a me deixar explorar minha criatividade como cientista;

Aos membros da banca, Prof. Mayron Vasconcelos e Profa. Oscarina Sousa, pelas valiosas contribuições para o trabalho;

Ao Prof. Alberto Nunes do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Estudos Ambientais Costeiros (Lanoa/CEAC) pelo fornecimento dos camarões;

À Prof^a. Cláudia Martins, pelos mais de quatro anos de orientação e incentivo constante, em especial pela inspiração para seguir na docência;

Aos meus companheiros do Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE), por sempre serem tão solícitos e fazerem o que fosse necessário para me ajudar, dentro de suas capacidades e conhecimentos;

A minha amiga Ellen Malveira, por toda ajuda com os experimentos envolvendo bactérias NB2 e por ter me acalmado e aturado os surtos quando tudo começou a dar errado;

As minhas queridas amigas do PDC, por todos os momentos de descontração, ajuda (com a vida e com os experimentos) e companheirismo;

Aos meus amigos da pós, Ana Claudia Carneiro, Ellen Malveira e Gabriel Melo pela troca de experiências e loucuras;

A minha família, por ser o alicerce e o ombro amigo que tornou tudo muito mais fácil do que poderia ser.

“Efetivamente, o escudo pode ser tão importante para a vitória quanto a espada ou a lança.”

Charles Darwin.

RESUMO

A resistência antimicrobiana (RAM) é um problema que se agrava a cada dia. O mal uso de antibióticos, assim como seu descarte incorreto no ambiente, uso excessivo na pecuária, e controle clínico insuficiente de infecções criam diversas pressões de seleção que influenciam a adaptação das bactérias. Dessa forma, com o passar do tempo, os patógenos têm ficado cada vez mais resistentes às drogas que conhecemos, compartilhando genes de resistência por transferência horizontal e nos encaminhando para uma era onde infecções bacterianas voltarão a ser a maior causa de mortes no mundo. A principal fonte conhecida de antibióticos são as actinobactérias, responsáveis por sintetizar a maior parte das drogas em uso atualmente, assim como os precursores das drogas sintéticas. Por serem microrganismos ubíquos, pode-se encontrar actinobactérias no solo, em sedimentos, em associação a plantas e a animais, tanto vertebrados quanto invertebrados. Diante disso, este trabalho propôs o isolamento e caracterização de actinobactérias do intestino do camarão-branco-do-pacífico, *Penaeus vannamei*, um nicho até então inexplorado, e avaliou sua capacidade de inibir patógenos de relevância clínica. O isolamento ocorreu a partir de uma diluição seriada do intestino macerado em solução salina seguido pelo *spread plate* nos meios SCA, GLM e Küster, seguido por purificação em meio ISP2. As actinobactérias foram caracterizadas quanto à cor do micélio aéreo e reverso, e à morfologia das cadeias de esporos, para então serem submetidas ao teste de atividade antimicrobiana contra sete patógenos pelo método do *cross streak*. Dos 109 isolados, 24 apresentaram características morfológicas de actinobactérias e foram selecionados para compor a coleção “Shrimp Gut Actinobacteria” (SGA), apresentando cores de micélio como verde, laranja, amarelo e cinza. Quanto à morfologia das cadeias de esporos, 58,3% da coleção apresentou morfologia *flexibilis*, 16,6% *retinaculum-apertum* e 16,6% *rectus*. Em quatro isolados não foi observada a formação de filamentos, com a micromorfologia sendo cocoide e bacilar. Nenhum isolado apresentou a morfologia *spira*, clássica de *Streptomyces*, o que pode indicar uma presença significativa de gêneros de actinobactérias raras. Dos 16 isolados escolhidas quanto à morfologia para o teste do *cross streak*, cinco apresentaram atividade inibitória sobre microrganismos patogênicos, com destaque para a SGA-18, que inibiu todas as bactérias indicadoras e foi a única a inibir *Salmonella enterica* e *Klebsiella pneumoniae*, e SGA-05, que inibiu cinco indicadoras. Esse é o primeiro trabalho a isolar actinobactérias simbióticas de camarão e um dos primeiros a isolá-las de crustáceos e testar seu potencial biotecnológico. O potencial inibitório desses isolados atesta a capacidade de actinobactérias inibirem tanto bactérias Gram-positivas quanto

Gram-negativas e evidenciam o potencial das actinobactérias como produtoras metabólitos antimicrobianos, criando oportunidades para pesquisas futuras envolvendo a purificação e caracterização desses compostos visando o desenvolvimento de bioprodutos, além de outras pesquisas se aprofundando no potencial biotecnológico da coleção SGA, como produção de enzimas e pigmentos.

Palavras-chave: *Streptomyces*; resistência a antimicrobianos; isolamento de actinobactérias; microbiota.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is a problem that is becoming more serious every day. Misuse of antibiotics, as well as their incorrect disposal in the environment, excessive use in livestock farming, and inadequate clinical control of infections create several selection pressures that influence the adaptation of bacteria. Thus, over time, pathogens have become increasingly resistant to the drugs we know, sharing resistance genes through horizontal transfer, leading us to an era where bacterial infections will once again be the leading cause of death in the world. The main known source of antibiotics is actinobacteria, which are responsible for synthesizing most of the drugs currently in use, as well as precursors of synthetic drugs. Since they are ubiquitous microorganisms, actinobacteria can be found in soil, sediments, and in association with plants and animals, both vertebrates and invertebrates. Therefore, this study proposed the isolation and characterization of actinobacteria from the intestine of the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*, a previously unexplored niche, and evaluated their ability to inhibit pathogens of clinical relevance. The isolation occurred from a serial dilution of the macerated intestine in saline solution followed by a spread plate in SCA, GLM, and Küster media, followed by purification in ISP2 medium. The actinobacteria were characterized according to the color of the aerial and reverse mycelium, and the morphology of the spore chains, and then subjected to the antimicrobial activity test against seven pathogens by the cross-streak method. Of the 109 isolates, 24 presented morphological characteristics of actinobacteria and were selected to compose the 'Shrimp Gut Actinobacteria' (SGA) collection, presenting mycelium colors such as green, orange, yellow and gray. Regarding the morphology of the spore chains, 58.3% of the collection presented *flexibilis* morphology, 16.6% *retinaculum-apertum* and 16.6% *rectus*. In four isolates, filament formation was not observed, with the micromorphology being coccoid and bacillary. None of the isolates presented the classic *Streptomyces*' *spira* morphology, which may indicate a significant presence of rare actinobacteria genera. Of the 16 isolates chosen for the cross-streak test according to their morphology, five presented inhibitory activity against pathogenic microorganisms, with an emphasis on SGA-18, which inhibited all indicator bacteria and was the only one to inhibit *Salmonella enterica* and *Klebsiella pneumoniae*, and SGA-05, which inhibited five indicator bacteria. This is the first work to isolate symbiotic actinobacteria from shrimp and one of the first to isolate them from crustaceans and test their biotechnological potential. The inhibitory potential of these isolates attests to the ability of actinobacteria to inhibit both Gram-positive and Gram-negative bacteria and highlights the

potential of actinobacteria as producers of antimicrobial metabolites, creating opportunities for future research involving the purification and characterization of these compounds aiming at the development of bioproducts, in addition to other research delving into the biotechnological potential of the SGA collection, such as the production of enzymes and pigments.

Keywords: *Streptomyces*; antimicrobial resistance; actinobacteria isolation; microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Resistência de bactérias causadoras de infecções do trato urinário e da corrente sanguínea (em porcentagem de isolados resistentes) a diferentes antibióticos no Brasil em 2021.....	19
Figura 1 - Esquematização da inoculação de microrganismos para avaliação da atividade antimicrobiana de actinobactérias pelo método do <i>cross-streak</i>	52
Figura 2 - Coleção “Shrimp Gut Actinobacteria” em meio ISP2.....	53
Figura 3 - Distribuição de frequências das cores de micélio aéreo e reverso das actinobactérias isoladas do intestino de camarão (SGA).....	55
Figura 4 - Morfologias das cadeias de esporos das actinobactérias isoladas do intestino de camarão (SGA), observadas via microcultivo com aumento de 1000x.....	58
Figura 5 - Dendrograma de similaridade dos isolados de actinobactérias da coleção SGA quanto às cores de micélio e micromorfologia.....	59
Figura 6 - Cepas inibidas pelas actinobactérias do intestino do camarão pelo método do <i>cross streak</i>	60
Figura 7 - Teste de atividade antimicrobiana das actinobactérias SGA03 (a) e SGA06 (b).....	61
Figura 8 - Teste de atividade antimicrobiana das actinobactérias SGA05 (a) e SGA06 (b).....	62
Figura 9 - Teste de atividade antimicrobiana da actinobactéria SGA18.....	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	O que é resistência a antimicrobianos (RAM) e o problema da saúde pública.....	17
3.2	Origens e disseminação da RAM.....	20
3.2.1	<i>Transferência horizontal de genes.....</i>	23
3.3	Novas fontes de antibióticos.....	27
3.4	Actinobactérias: características gerais.....	31
3.5	Ciclo de vida das actinobactérias.....	33
3.6	Actinobactérias como fonte de antibióticos e outros bioprodutos.....	35
3.7	Potencial biotecnológico de actinobactérias simbióticas.....	40
3.8	Camarão-branco-do-pacífico e sua microbiota.....	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1	Obtenção dos camarões.....	49
4.2	Isolamento das actinobactérias.....	49
4.3	Armazenamento da coleção.....	50
4.4	Caracterização cultural dos isolados.....	50
4.5	Caracterização micromorfológica dos isolados.....	50
4.6	Cepas para atividade antimicrobiana.....	51
4.7	<i>Screening</i> de atividade antimicrobiana.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	Criação da coleção.....	53
5.2	Caracterização cultural dos isolados.....	54
5.3	Caracterização micromorfológica dos isolados.....	57
5.4	Escolha dos isolados para os testes de atividade antimicrobiana.....	59
5.5	Teste de atividade antimicrobiana.....	60
6	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Apesar de ter começado a causar uma preocupação cada vez maior apenas no final do século XX (File, 1999), a resistência a antimicrobianos (RAM) é um fenômeno que ocorre há milhões de anos, antes mesmo do homem começar a investigar e compreender o que é uma bactéria. Bactérias isoladas do *permafrost* e datadas de 30 mil anos atrás já apresentavam resistência à vancomicina, e mais recentemente, *Staphylococcus aureus* tem mostrado resistência à penicilina desde que Fleming a descobriu no século XX (Morrison; Zembower, 2020). Na década de 1940, a penicilina era um antibiótico excepcional, o que levou a seu uso indiscriminado para tratar as mais diversas infecções. Contudo, isso causou a gradual redução de sua eficiência devido à adaptação das bactérias (Abushaheen *et al.*, 2020). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), RAM é um fenômeno que ocorre quando microrganismos (bactérias, fungos, parasitas, etc.) deixam de responder a drogas antimicrobianas. Dessa forma, esses agentes se tornam ineficazes e as infecções se tornam cada vez mais graves (Organização, 2023).

O desenvolvimento de RAM é uma forma de resposta de fungos, bactérias e vírus à administração dessas drogas, o que leva à sua gradual perda de eficiência. Ao mesmo tempo que a taxa de descobrimento de novos antibióticos não acompanha o aumento em escala global da RAM, os patógenos resistentes são cada vez mais selecionados pelo uso desnecessário e indiscriminado de antimicrobianos. Esse fenômeno aumenta seu perigo e compromete o sistema imunológico de pacientes vulneráveis como aqueles em quimioterapia, tratamento contra HIV, malária e outras doenças (Zhu; Huang; Yang, 2022).

Um exemplo é o uso indiscriminado de antibióticos durante a pandemia de COVID-19. Infecções respiratórias como influenza, doença pneumocócica e tuberculose apresentaram uma redução em suas taxas devido às medidas de profilaxia da COVID, porém a semelhança sintomática da infecção do SARS-CoV-2 com doenças respiratórias bacterianas como pneumonia, a falta de medicamentos específicos e a alta taxa de co-infecção bacteriana e fúngica levou à aplicação de vários antibióticos de amplo espectro nesses pacientes. O resultado é que a taxa de Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos subiu de 6,7% em 2019 para 50% em abril de 2020. Fenômeno semelhante ocorreu com *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (Lai *et al.*, 2021). A alta taxa de internação nesse período também foi preocupante, visto que a infecção por microrganismos resistentes costuma ser ainda mais severa em pacientes imunocomprometidos e em idosos, que são grupos de risco da COVID-19, e a infecção desses pacientes em unidades de tratamento como UTIs estimula o

surgimento de RAM. A OMS expressou sua preocupação de que essas consequências da pandemia poderiam desfazer todos os esforços empregados para reduzir a RAM ao longo dos anos. Além disso, somado ao fato da taxa de descobrimento e comercialização de novos antibióticos ter decaído muito desde a década de 1990, o mal uso de eventuais novas drogas poderia reduzir drasticamente seu período de eficácia (Pulingam *et al.*, 2022).

Estima-se que uma média de 1,27 milhão de pessoas morreram em 2019 no mundo em decorrência direta da RAM e 4,95 milhões em decorrência indireta. Dentre esses números, destacam-se as infecções causadas por *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, responsáveis por 929 mil mortes em decorrência da RAM e 3,57 milhões associadas à RAM. Infecções do aparelho respiratório inferior são as mais problemáticas, com 1,5 milhão de mortes associadas à RAM (Zhang *et al.*, 2024). Se as tendências no uso de antibióticos seguirem o padrão atual, espera-se que esse número atinja os 10 milhões de mortes por ano em 2050, representando uma perda econômica cumulativa de US\$100 trilhões e superando as mortes por câncer. Hoje, as mortes por infecções causadas pela RAM já ultrapassaram as mortes por HIV, tuberculose e malária, sendo a 3ª maior *causa mortis* no mundo, e esse problema é ainda mais grave em países em desenvolvimento. Em resumo, se essa situação não for revertida, microrganismos resistentes vão matar mais de 444 milhões de pessoas até 2100. Por isso há urgência no controle de prescrição e venda de antibióticos, e tão importante quanto isso, o incentivo em inovações biotecnológicas de controle e diagnóstico de infecções, assim como desenvolvimento de novos antimicrobianos e vacinas (Ciapponi *et al.*, 2023; Samreen *et al.*, 2021).

Como forma de combate à RAM, a OMS estabeleceu em 2017 uma lista de patógenos resistentes de prioridade global, a fim de estimular pesquisas e desenvolvimento de novos antibióticos. Essa lista está dividida em três níveis de prioridade: média, alta e crítica. Dentre o grupo de prioridade crítica, encontram-se as Gram-negativas *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, e *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. resistentes a cefalosporinas de terceira geração. Dentre o grupo de alta prioridade estão as Gram-positivas *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina e *S. aureus* resistente a meticilina e vancomicina. Juntas, essas bactérias compõem o grupo ESKAPE, responsável pela maior parte das infecções hospitalares mais perigosas e letais tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Por apresentar diversos mecanismos de resistência como alteração de alvos, redução da absorção das drogas, produção de enzimas e bombas de efluxo, além da capacidade de formar biofilmes, bactérias ESKAPE apresentam resistência a várias das principais classes de antibióticos como macrolídeos, tetraciclina, beta-lactâmicos,

combinações de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases, e até antibióticos de último recurso como glicopeptídeos, carbapenêmicos e polimixinas (Denissen *et al.*, 2022).

A ordem Actinomycetales, que abriga as actinobactérias, é responsável por produzir 45% dos metabólitos bioativos conhecidos. Esse número sobe para cerca de 75% ao se falar de antibióticos, principalmente antibacterianos, que são em sua maioria produzidos pelo gênero *Streptomyces* e apresentam eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por isso, nas últimas décadas tem se buscado actinobactérias em diversos habitats, principalmente no solo. Porém, a taxa de descobrimento de novas moléculas em actinobactérias tem diminuído, o que incentiva a busca por novas espécies em habitats fora do habitual (Selim; Abdelhamid; Mohamed, 2021).

O cloranfenicol, isolado pela primeira vez em 1947 de *Streptomyces venezuelae*, é o membro fundador da classe de antibióticos anfenicol. Ele exerce seu efeito antimicrobiano ligando-se reversivelmente à subunidade ribossômica 50S, inibindo a síntese de proteínas. Da mesma forma, a clorotetraciclina, descoberta em 1948 e produzida por *Streptomyces aureofaciens*, introduziu a classe das tetraciclina. As tetraciclina também têm como alvo a síntese de proteínas, mas agem na subunidade ribossômica 30S. Em 1949, a eritromicina, o primeiro antibiótico macrolídeo, foi isolada de *Saccharopolyspora erythraea*. Os macrolídeos, que hoje são a segunda classe de antibióticos mais prescrita, também se ligam à subunidade ribossômica 50S, interrompendo a síntese de proteínas. Outra classe notável, as estreptograminas, foi introduzida em 1952 com a virginamicina, isolada de *Streptomyces virginiae*. As estreptograminas consistem em duas moléculas estruturalmente distintas — uma macrolactona poli-insaturada e um hexadepsipeptídeo cíclico, que se ligam à subunidade 50S. Embora cada componente tenha atividade limitada sozinho, seu efeito sinérgico os torna terapeuticamente valiosos. Glicopeptídeos, como a vancomicina, descoberta em 1956 e produzida por *Amycolatopsis orientalis*, têm como alvo a síntese da parede celular. A vancomicina continua sendo um antibiótico crítico de último recurso para tratar infecções resistentes. A daptomicina, um lipopeptídeo cíclico cálcio dependente por *Streptomyces roseosporus*, representa a classe dos lipopeptídeos. Ela exibe potente atividade antimicrobiana, particularmente contra patógenos Gram-positivos, superando antibióticos mais antigos como a polimixina E (Cunha; Fonseca; Calado, 2019). *Saccharopolyspora erythraea* produz eritromicina, usada para tratar infecções respiratórias como a doença do legionário. A gentamicina, produzida por *Micromonospora purpurea*, pode ser usada para tratar uma gama de infecções causadas por patógenos Gram-positivos e Gram-negativos. Finalmente, a monesina pode ser usada para tratar infecções Gram-positivas que são resistentes a outros

antibióticos e foi isolada pela primeira vez de *Streptomyces cinnamomensis* (Jagannathan *et al.*, 2021). Estes são alguns antibióticos derivados de actinobactérias e destacam a importância de seus metabólitos secundários na terapia antimicrobiana.

Um dos diversos locais onde é possível encontrar actinobactérias é em simbiose com animais, em especial em seu trato gastrointestinal. Nesse ambiente, actinobactérias exercem diversas funções ecológicas, como auxiliar na absorção de nutrientes, na manutenção da homeostase e na imunidade, pela inibição do crescimento de patógenos. Em crustáceos, como o camarão, que não possuem imunidade adaptativa, essa relação é primordial para sua sobrevivência (Li *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2024). Por isso, esse trabalho hipotetiza que actinobactérias do intestino de camarões cultivados apresentam produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. A hipótese foi confirmada a partir do isolamento inédito e caracterização desses microrganismos, seguidos de teste contra sete bactérias patogênicas de preocupação da OMS.

2 OBJETIVOS

Os objetivos geral e específicos da pesquisa são apresentados a seguir.

2.1 Objetivo geral

Isolar, caracterizar e avaliar o potencial antimicrobiano de actinobactérias simbióticas que colonizam o intestino do camarão-branco-do-pacífico (*Penaeus vannamei*).

2.2 Objetivos específicos

- Aplicar métodos seletivos para acessar e isolar actinobactérias do intestino de camarões cultivados;
- Estabelecer uma coleção de culturas com as actinobactérias simbióticas do intestino de *P. vannamei* cultivados;
- Caracterizar morfológicamente os isolados catalogados na coleção;
- Verificar a atividade antimicrobiana das actinobactérias pelo método do *cross streak* frente a bactérias indicadoras patogênicas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção, são delineados tópicos importantes para fundamentar e contextualizar a discussão acerca dos conceitos e mecanismos de resistência a antimicrobianos (RAM), destacando cepas de microrganismos de relevância global, além de explorar estratégias potenciais no combate à RAM como novas fontes de prospecção de antibióticos com destaque para actinobactérias raras.

3.1 O que é resistência a antimicrobianos (RAM) e o problema da saúde pública

Antes do descobrimento da penicilina, as doenças infecciosas eram a principal causa de mortes no mundo. A introdução desse medicamento no mercado aumentou a expectativa de vida humana em uma média de 23 anos. Contudo, se não forem adotadas medidas preventivas, essa situação pode se reverter até 2050: doenças infecciosas voltarão a ser a maior *causa mortis* do mundo, mas dessa vez causadas por microrganismos resistentes. Por isso, a RAM tem sido considerada a “Pandemia Silenciosa”, visto que as taxas de RAM sobem muito mais rápido que o descobrimento de novos antibióticos (Tang; Millar; Moore, 2023).

A resistência a antimicrobianos ocorre, em resumo, quando uma bactéria adquire um gene de resistência a partir de um determinado *pool* genético. Esse gene permite que a bactéria sobreviva a condições hostis causadas pelo agente antimicrobiano, que pode ser uma droga, mas também podem ser metais, biocidas, resíduos químicos, etc. A partir do momento que a bactéria absorve esse gene de resistência, ela consegue tornar o agente antimicrobiano parcial ou totalmente ineficiente contra si (Djordjevic *et al.*, 2024).

Por convenção, o padrão de resistência de microrganismos pode ser dividido em três grupos: multirresistentes (MDR), que são não-sensíveis a pelo menos um agente em 3 ou mais classes diferentes de antimicrobianos; extensivamente resistentes (XDR), que são não-sensíveis a pelo menos um agente em todas menos 2 ou menos classes diferentes de antimicrobianos; e pan-resistentes (PDR), que são não-sensíveis a todos os antimicrobianos em todas as classes (Magiorakos *et al.*, 2011). Vale ressaltar que algumas bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*, possuem diferentes cepas com diferentes padrões de resistência. Por isso, *P. aeruginosa*, principalmente pan-resistente (PDR-PA), é um microrganismo de importância crítica para a OMS devido a sua resistência a todos os antibióticos conhecidos, mas apesar disso sua epidemiologia e fatores de risco ainda não são completamente compreendidos (Kamal *et al.*, 2024).

Essa classificação, contudo, é baseada somente em testes de susceptibilidade *in vitro* e desconsidera a ação das drogas no paciente, assim como sua farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade, o que dificulta o tratamento. Por isso, o Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) introduziu novas classificações em 2015: resistente a fluoroquinolona (FQR), resistente a cefalosporinas de amplo espectro (ESCR) e resistente a carbapenêmicos (CR). Mais recentemente, emergiu o conceito de resistência difícil de tratar (DTR) em infecções causadas por bactérias Gram-negativas resistentes a drogas de primeira linha. Esse conceito se provou eficiente para fazer prognósticos e desenhos experimentais de ensaios clínicos mais precisos (Cosentino; Viale; Giannella, 2024).

Como forma de contra-ataque à disseminação da RAM, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs, em 2015, o Sistema de Vigilância Global de Resistência a Antimicrobianos – (GLASS), que reuniria dados laboratoriais e epidemiológicos de pacientes internados e em ambulatorios para entender melhor os impactos da RAM na sociedade (Pillonetto *et al.*, 2021). No início de sua implementação, o GLASS apenas monitorava e reportava as taxas e tendências da RAM de seus 42 países colaboradores. Já no último relatório, em 2022, foram divulgados tanto dados de RAM como também de consumo de antibióticos, e dessa vez de 126 países. Sem surpresas, observou-se forte correlação entre os níveis de RAM e de uso de antimicrobianos. Contudo, apesar dos esforços da OMS na gestão do GLASS, a exatidão dessa iniciativa ainda é limitada pela falta de dados decorrente da falta de sistemas de vigilância robustos em diversos países, principalmente aqueles subdesenvolvidos e em desenvolvimento. A falta de estrutura para coleta desses dados a nível nacional e regional e a falta de compartilhamento de informações entre redes de laboratórios, assim como a baixa adesão de países ao GLASS ainda são gargalos para o melhor entendimento da RAM a nível global, continental, nacional e regional (Ajulo; Awosile, 2024).

Desde 2014, o Brasil já tem um sistema próprio de vigilância de infecções hospitalares (principalmente infecções sanguíneas relacionadas a cateter em UTIs) coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Como a abordagem do GLASS é diferente, visto que trata de uma abordagem *one health*, o Brasil só veio se juntar ao GLASS em 2017, iniciando assim o BR-GLASS (Pillonetto *et al.*, 2021). No ano seguinte, foi publicado o Plano Nacional de Ação para combate a RAM, documento elaborado pelo Ministério da Saúde em parceria com a ANVISA, Ministério da Agricultura, dentre outros. A ação do Brasil na adesão ao GLASS é emblemática, visto que esse país possui um dos maiores sistemas de saúde pública do mundo (Sistema Único de Saúde – SUS) e um histórico invejável de controle de doenças infecciosas (Corrêa *et al.*, 2023).

O GLASS não possui dados de consumo de antibióticos no Brasil, mas os dados de resistência foram atualizados em 2022 com os dados referentes a 2021. Dentre os 4 tipos de infecção considerados pelo GLASS, as predominantes foram do trato urinário (13,9 por milhão de habitantes) e de corrente sanguínea (4,4 por milhão de habitantes) (Quadro 1). No caso da *Neisseria gonorrhoeae*, bactéria causadora da gonorreia, 82,4% dos isolados avaliados apresentaram resistência à ciprofloxacina (Organização, 2022).

Quadro 1 – Resistência de bactérias causadoras de infecções do trato urinário e da corrente sanguínea (em porcentagem de isolados resistentes) a diferentes antibióticos no Brasil em 2021

Classes	Antibióticos	Trato urinário		Corrente sanguínea		
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
Fluoroquinolonas	Levofloxacina	45.1	41.5	43.6	39.5	-
	Ciprofloxacina	43.8	41.3	44.2	52.7	-
Sulfonamidas	Co-trimoxazol	50.0	45.3	55.0	59.5	-
Cefalosporinas de terceira geração	Ceftriaxona	42.1	48.9	48.2	68.0	-
	Ceftazidima	29.7	44.4	26.2	55.8	-
	Cefotaxima	39.3	49.3	38.7	58.9	-
Cefalosporinas de quarta geração	Cefepima	30.8	44.1	34.9	54.6	-
Penicilinas	Ampicilina	76.6	-	89.0	-	-
Tetraciclinas	Minociclina	-	-	-	-	9.1
	Tigeciclina	-	-	-	-	11.3
Aminoglicosídeos	Amicacina	-	-	-	-	47.0
	Gentamina	-	-	-	-	49.7
Polimixinas	Colistina	1.2	5.5	0.8	5.1	3.2
Carbapenêmicos	Imipenem	2.6	14.4	1.2	16.0	66.2
	Doripenem	3.2	14.0	1.7	29.0	43.7
	Ertapenem	2.8	14.8	1.7	17.1	-
	Meropenem	1.7	11.4	1.2	15.7	60.9

O sinal (-) implica ausência de dados de resistência no GLASS, não necessariamente sensibilidade ou falta de estudos.

Fonte: Organização, 2022.

O conceito de RAM e suas complexidades levou ao surgimento do termo “resistoma”, que compreende todos os genes de resistência a antimicrobianos (ARG) em patógenos, em microrganismos produtores de antibióticos e em bactérias ambientais benignas. Esses genes podem agir direta ou indiretamente no combate aos antibióticos, e uma única cepa pode ter diversos mecanismos que integram uma resistência combinatória. Genes que codificam atividades metabólicas tradicionais podem evoluir para se tornar genes de resistência e são chamados de “elementos de protoresistência” (Wright, 2010). Pode-se distinguir o resistoma

em três esferas: aquele associado a drogas individuais, como o conjunto de genes que confere resistência a cefalosporinas; a localizações específicas, como os genes de resistência presentes em um solo ou em um hospital; e o conjunto de genes de resistência de um determinado indivíduo (Hobson; Chan; Wright, 2021).

Além disso, a resistência de um microrganismo a antimicrobianos pode ser intrínseca, adquirida ou adaptativa. A resistência intrínseca é particular para cada gênero ou espécie e ocorre pela falta de alvos para os antimicrobianos ou presença de enzimas inativadoras e/ou bombas de efluxo. *Mycoplasma*, por exemplo, são resistentes a glicopeptídeos e beta-lactâmicos por não possuir parede celular. Já a resistência adquirida ocorre pela transferência de elementos genéticos móveis por transposons, plasmídeos, integrinas ou ilhas genômicas. Esse processo é facilitado quando o organismo sensível é naturalmente competente, como *Acinetobacter* spp., permitindo assim que adquira material genético diretamente do ambiente. Por fim, a resistência adaptativa ocorre em resposta a estresses bióticos e abióticos e deixa de existir em algumas gerações uma vez que o estresse some. Esse fenômeno reversível é fruto de alterações na expressão gênica e metilações (Asghar *et al.*, 2024).

3.2 Origens e disseminação da RAM

Antibióticos agem em diferentes mecanismos e doses. Devido a essas diferenças, é possível que um tratamento incompleto ou com doses erradas não mate todas as bactérias indesejadas, permitindo que as bactérias que sobreviveram passem por mutações e desenvolvam resistência por meio da seleção natural (Biondo, 2023). Esse processo básico da natureza sempre irá levar as bactérias a resistirem aos antimicrobianos quando expostos a esses agentes, por isso novos antibióticos estão fadados a perder sua eficiência logo que disponíveis no mercado se não forem adotadas estratégias para restringir seu uso (Mouton, 2013). Essa problemática já foi levantada por Alexander Fleming em 1945, em seu discurso de aceitação do Nobel. Em sua fala, ele levanta uma situação hipotética:

Sr. X está com dor de garganta. Ele compra um pouco de penicilina e se administra, não o suficiente para matar os estreptococos, mas o suficiente para educá-los a resistir à penicilina. Ele então infecta a esposa dele. Sra. X contrai pneumonia e é tratada com penicilina. Como os estreptococos são agora resistentes à penicilina, o tratamento falha. Sra. X morre. Quem é o principal responsável pela morte da Sra. X? O Sr. X, cujo uso negligente da penicilina mudou a natureza do micróbio. Moral: **Se você usa penicilina, use o suficiente** (Fleming, 1945).

Mesmo que as bactérias só estejam sendo desafiadas antropicamente com antibióticos por menos de 100 anos, elas já passaram por bilhões de anos de seleção natural no enfrentamento a ameaças bióticas. Essas defesas antigas estão diretamente ligadas a como as bactérias respondem aos tratamentos com antibióticos hoje em dia. Por exemplo, os genes de resistência à meticilina em MRSA surgiram em *S. aureus* associadas a ouriços como forma de defesa a beta-lactâmicos sintetizados por fungos. Algumas bactérias apresentam pré-adaptações, ou seja, defesas naturais contra uma miríade de ameaças, o que pode incluir as drogas utilizadas na clínica. Para que uma nova alternativa terapêutica entre no mercado, é necessário que ela seja capaz de superar essas adaptações pré-históricas que tornam as bactérias tão difíceis de vencer (Smith *et al.*, 2023).

Assim como o já mencionado uso inadequado de antibióticos e falta de conscientização levando ao uso excessivo, as principais causas da RAM incluem as más condições de saneamento e higiene, liberação de resíduos de antibióticos no meio ambiente via esterco animal, e o uso impróprio de antibióticos como promotores de crescimento em animais. Esses fatores contribuem para a pressão seletiva que favorece o desenvolvimento de infecções bacterianas multirresistentes na comunidade. Ao se focar o debate nos animais, é importante considerar que bactérias resistentes podem contaminar a comida humana de várias formas, visto que todos os estágios de processamento contêm bactérias resistentes e ARGs. Em relação ao uso de antibióticos nesses animais, considera-se que se usa 172 mg/kg de carne de porco, 148 mg/kg de frango e 45 mg/kg de carne bovina, valores que podem dobrar nos países em desenvolvimento do BRICS (Samreen *et al.*, 2021).

A maior parte dos antibióticos usados em humanos é aplicada também para uso veterinário, inclusive de forma profilática e como promotora de crescimento. Estima-se que o volume de antibióticos utilizado a nível global em animais é maior que em humanos, daí a importância de se atentar a essa importante fonte de RAM. A maior parte da dose aplicada não é absorvida completamente, dessa forma, sendo excretada no ambiente. Se fertilizantes como esterco não forem devidamente tratados, essa contaminação volta para o solo, plantas e lençóis freáticos. Além disso, as doses de antimicrobianos aplicadas na aquicultura são maiores do que na criação de gado, gerando um grande problema devido à permanência por tempo indeterminado desses compostos químicos nos corpos aquíferos, onde se espalham rapidamente exercendo pressão de seleção (Velazquez-Meza *et al.*, 2022; Djordjevic *et al.*, 2024). Ecossistemas aquáticos como lagos e lagoas próximos de grandes cidades, assim como o solo das proximidades, são os mais vulneráveis à contaminação por antibióticos. Dessa

forma, a água e os sedimentos passam a desempenhar um papel importante na ecologia e na evolução de ARGs (Mehdi *et al.*, 2018).

Ao contrário do uso profilático ou terapêutico, a aplicação de antibióticos como promotores de crescimento se dá em doses bastante reduzidas. Contudo, pela sua ampla utilização, esses números pequenos se multiplicam, com expectativa de aumentar 67% entre 2010 e 2030 chegando a mais de 100.000 toneladas por ano (Ma; McAllister; Guan, 2021). Ainda não se sabe exatamente a forma de atuação de antibióticos como promotores de crescimento no gado, mas existem duas hipóteses principais. A primeira, “bacteriocêntrica”, propõe que as mudanças na microbiota causadas pelo antibiótico levam ao desenvolvimento de um sistema mais eficiente, com a alteração nas relações ecológicas e o favorecimento de bactérias capazes de extrair mais energia dos alimentos. Já a segunda hipótese, “hospedeirocêntrica”, afirma que os antibióticos agiriam direta ou indiretamente na própria fisiologia do intestino do hospedeiro. Considerando que as doses de antibióticos usadas são menores que as concentrações inibitórias dos patógenos intestinais e que as alternativas não-antimicrobianas apresentam efeitos inconsistentes quando comparado aos antimicrobianos, acredita-se que o antibiótico promoveria uma redução da inflamação fisiológica normal da mucosa intestinal, reduzindo o custo catabólico dessa inflamação e permitindo uma maior alocação de energia para processos anabólicos como o desenvolvimento dos músculos (Brown *et al.*, 2017).

Ao se aplicar a teoria da evolução no que diz respeito à RAM, conclui-se que a RAM deve vir acompanhada de custos de *fitness* em diversas frentes na ausência de antibióticos. Bombas de efluxo, por exemplo, são extremamente onerosas energeticamente para as bactérias. Se não fosse assim, todos os patógenos seriam resistentes e essa resistência nunca seria perdida (Herren; Baym, 2022). Esse fenômeno é chamado de *trade-off*: a melhoria em um traço ocorre em demérito de outro traço. O *trade-off* de patógenos resistentes é de particular importância para a saúde pública, uma vez que essas bactérias costumam ter taxas de crescimento e virulência reduzidas na presença de antibióticos. Daí os esforços de controlar o uso de antibióticos, uma vez que mutações difíceis de se vencer podem se tornar menos frequentes na ausência das drogas (Basra *et al.*, 2018).

Existem alguns tipos de resistência por exposição às drogas, cada um com diferentes impactos de *fitness* na célula. O já mencionado *trade-off* também é conhecido como sensibilidade colateral ou pleiotropia antagônica, e acontece quando a resistência a uma droga está associada a uma hipersensibilidade a outras drogas. Isso geralmente ocorre com agentes com diferentes mecanismos de ação. Porém, também pode ocorrer da resistência a uma droga

promover a resistência a drogas de outros grupos pela acumulação de diferentes genes de resistência no que se chama de *trade-up*, co-resistência ou pleiotropismo sinérgico. Nesse fenômeno, a administração de diferentes antibióticos em um paciente pode selecionar mutantes que sejam resistentes a todas essas drogas simultaneamente, portanto a terapia de combinação de antibióticos pode levar à co-seleção de isolados persistentes. A resistência cruzada se refere à resistência a diversos antimicrobianos de uma mesma classe por compartilharem o mesmo mecanismo de ação. Vale ressaltar que a resistência cruzada implica cross-seleção, ou seja, a administração de um antibiótico pode selecionar isolados resistentes também a outras drogas do mesmo grupo. Felizmente, o estabelecimento de um determinado genótipo não é garantido quando uma defesa específica está sob forte seleção natural, visto que, por seleção frequência-dependente, a utilidade de um gene específico pode diminuir à medida que ele se torna mais comum e consequentemente este pode ser perdido (Smith *et al.*, 2023; Yekani *et al.*, 2023).

3.2.1 Transferência horizontal de genes

Apesar das mutações ajudarem a explicar o surgimento de novos ARGs, sua disseminação está mais associada à transferência horizontal de genes (HGT) de resistência pré-existent. Bactérias costumam utilizar todos os métodos de HGT para adquirir ARGs, mas algumas espécies tendem a se especializar em certos métodos, especialmente conjugação, transdução e transformação. Por exemplo, enterobactérias adquirem ARGs mais frequentemente via conjugação, *Haemophilus* via transformação natural e *Staphylococcus* via transdução e conjugação. Esses genes costumam se aglomerar em plasmídeos, e frequentemente um único plasmídeo pode conter genes de resistência a diversos antimicrobianos, como já foi encontrado em *E. coli* um plasmídeo contendo ARGs a aminoglicosídeos, sulbactam, tetraciclina, compostos quaternários de amônio, prata e telurito (Barlow, 2009). Uma vez que um ARG se estabelece com sucesso em plasmídeos, sua disseminação ocorre de forma muito rápida. A transferência de plasmídeos entre cepas clinicamente relevantes já levou à disseminação de genes de resistência a beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamidas e outras classes (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

Pressões bióticas e abióticas como antibióticos, metais, desinfetantes e variações nos padrões de qualidade da água são conhecidas por gerar espécies reativas de oxigênio, que interferem na replicação do DNA e na síntese de parede celular. Esses processos ativam o

sistema SOS nas bactérias, que é um potente indutor da HGT. Dessa forma, quanto mais estressada está uma bactéria, mais ela sofre mutações devido à pressão de seleção e mais ela transfere esses genes para seus pares (Djordjevic *et al.*, 2024).

O método mais frequente de disseminação de ARGs é a conjugação. Nesse mecanismo, a troca de material genético ocorre através de um *pilus* ou pela ação de adesinas e requer a aproximação física das duas bactérias (Wang *et al.*, 2021). A troca de material genético por conjugação ocorre em duas etapas: inicialmente, o DNA é mobilizado por proteínas codificadas por genes MOB, do qual o mais frequente codifica uma proteína relaxase; por fim, o DNA é transportado pelo sistema de secreção. O mais comum é o sistema de secreção tipo IV (T4SS), que é um complexo proteico codificado pelos genes MPF. O T4SS é conservado na maior parte das bactérias capazes de realizar conjugação e é composto por quatro seções: o *pilus*, o complexo principal de canais, a plataforma na membrana interna e as ATPases que fornecerão energia para o transporte do DNA e a síntese do *pilus* (Cabezón; de la Cruz; Arechaga, 2017).

O DNA que é transferido por conjugação é chamado de elemento genético móvel (MGE) e pode ser elementos integrativos e conjugativos (ICEs) ou, mais importante, plasmídeos conjugativos. Como já mencionado, esses plasmídeos são capazes de carregar diversos genes de resistência ao mesmo tempo, mas também podem ter genes que contribuem para o *fitness* da bactéria, por exemplo trazendo novas rotas metabólicas. Dessa forma, a RAM pode sofrer co-seleção uma vez que está associada a uma plataforma genética complexa (McInnes *et al.*, 2020). A HGT por conjugação é a mais comum e eficiente, pois é um método de transferência de genes que surgiu com esse fim, diferente da transformação e a transdução, onde a assimilação do DNA bacteriano está mais para um efeito colateral de fenômenos naturais. Quando comparada a esses outros métodos, a conjugação fornece mais proteção aos MGEs e uma forma mais eficiente de inseri-los na célula do que a transformação, além de ter uma maior gama de hospedeiros do que a transdução por bacteriófagos (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

Como forma de combate à conjugação, tem se pesquisado cada vez mais sobre inibidores de conjugação (COINs), cujo nome é autoexplicativo. COINs geralmente agem sobre o sistema de conjugação codificado no plasmídeo ou nas proteínas do hospedeiro envolvidas na conjugação. Idealmente, um COIN deve agir sobre uma gama de plasmídeos que contém ARGs, sobre uma gama de espécies de patógenos ou de bactérias fonte de ARGs e não pode reduzir o *fitness* da bactéria, uma vez que isso geraria uma pressão de seleção favorecendo a permanência de bactérias resistentes ao COIN. A terapia de COINs em

associação a antibióticos, por exemplo como pré-tratamento antes de procedimentos que demandarão um tratamento com antibióticos, é uma estratégia promissora, visto que muitos mecanismos de resistência e os plasmídeos propriamente ditos costumam estar associados a um custo de *fitness*, e dessa forma as células sem plasmídeo poderiam ter vantagem contra aquelas com plasmídeo (Graf *et al.*, 2018).

Outra forma importante de disseminação de RAM é a transformação natural. Nesse processo, uma bactéria competente absorve um fragmento de DNA livre no meio e o assimila ao seu cromossomo ou a um replicon extra-cromossômico (Jin *et al.*, 2020). Geralmente, esse DNA livre se origina de outras bactérias mortas ou lisadas, por isso esse DNA costuma ser abundante no ambiente e, ao se ligar a superfícies minerais ou substâncias húmicas, o DNA livre pode ser estabilizado e persistir de horas até meses. Uma vez que ARGs frequentemente se localizam em plasmídeos, e esses são naturalmente persistentes em diversos ambientes, é possível de começar a entender o papel da transformação na RAM (Wang *et al.*, 2020).

Para que a transformação ocorra, é necessário que algumas condições sejam cumpridas: deve haver DNA no meio extracelular, a bactéria receptora deve estar no estado de competência e o DNA translocado deve ser estabilizado, seja por integração ao cromossomo ou recircularização para dar origem a um plasmídeo. Mais de 80 espécies de bactérias são naturalmente competentes, mas os mecanismos por trás disso ainda não são totalmente compreendidos. Apesar disso, já se sabe que falta de nutrientes, presença de peptídeos específicos e até mesmo antibióticos podem atuar como gatilhos para a indução da competência. Dessa forma, observa-se que além de selecionar cepas resistentes, os antibióticos também são capazes de estimular a obtenção de ARGs via transformação. Já se observou que genes de resistência a estreptomicina, rifampicina, eritromicina, ácido nalidíxico e kanamicina já foram assimilados por diversas bactérias via transformação (Von Wintersdorff *et al.*, 2016; McInnes *et al.*, 2020).

De forma geral, o mecanismo da transformação possui 3 etapas: a ligação do DNA livre à membrana externa; a clivagem controlada e protegida da dupla fita; e o transporte do DNA através da membrana (Lu *et al.*, 2020). Em bactérias Gram-negativas, esse processo depende de um mecanismo para absorver o DNA, chamado de *pili* tipo IV (T4P), e um mecanismo para translocar o DNA, chamado de sistema Com. O T4P media o transporte do DNA através da membrana externa até o periplasma, a partir de onde o sistema Com o converte em fita simples e finaliza a translocação através da membrana interna (Yu *et al.*, 2022). O ponto chave da transformação é que ela não depende de um doador viável. Se uma bactéria com ARGs morrer, esses genes serão liberados no meio e podem persistir caso sejam

adsorvidos ou complexados com alguma superfície, dessa forma podendo ser inserido em uma célula viável via transformação e torná-la resistente (Jiang *et al.*, 2022).

O terceiro método principal de transferência horizontal de genes é chamado de transdução e trata da transferência de DNA mediada por um bacteriófago, ou simplesmente fago. No caso de fagos temperados, o DNA viral é incorporado ao cromossomo bacteriano no sítio *att* e permanece dormente, na forma de profago. O profago pode permanecer dormente por inúmeras gerações, sendo transmitido verticalmente para diversas gerações da bactéria até que algum estresse acione o sistema SOS. Em resposta, será iniciado o ciclo lítico, a partir de onde se iniciará a produção das partículas do bacteriófago e a lise celular. Já no caso de fagos virulentos não ocorre essa incorporação do DNA, e sim o acionamento imediato do ciclo lítico (Colavecchio *et al.*, 2017; Borodovich *et al.*, 2022). Cada fago possui seu leque de possíveis alvos bacterianos, que pode variar desde uma cepa específica até diversas espécies diferentes. Contudo, hoje já se pode afirmar com segurança que os fagos espécie-específicos são os mais envolvidos na transdução de ARGs (Gabashvili *et al.*, 2020).

A transdução pode ocorrer de duas formas gerais. O fago pode, erroneamente, encapsular apenas um fragmento de DNA da bactéria, que pode ser genômico ou um plasmídeo. Assim, o fago não conterá DNA viral e a bactéria a ser infectada não estará sujeita a progenia. Esse tipo de transdução é chamado de transdução generalizada. Alternativamente, existe a transdução especializada, onde o fago comete um erro ao excisar o DNA a ser transferido e, no lugar de absorver apenas o profago, encapsula também sequências de genes bacterianos adjacentes. Como envolve apenas o DNA adjacente ao DNA viral, a transdução especializada não possui tanto impacto na HGT de ARGs quanto a generalizada (Watson; Staals; Fineran, 2018).

Sugere-se que fagos possuam um papel importante na transferência de ARGs entre bactérias, principalmente pela abundância de ARGs nos genomas virais, em especial no solo. Apesar disso, a importância dos bacteriófagos nesse contexto ainda não é amplamente compreendida (Zhang *et al.*, 2022). O que se sabe é que bacteriófagos podem transferir para as bactérias genes que as tragam benefícios, como ARGs, visando a sobrevivência e disseminação viral. Já foi detectada a HGT via transdução de genes de resistência a eritromicina, tetraciclina, gentamicina e beta-lactâmicos no geral. Além disso, fagos carregando múltiplos ARGs já foram encontrados em esgotos, águas superficiais e amostras humanas e animais. Com isso em mente, e sob a luz de recentes estudos metagenômicos, pode-se concluir que o papel dos bacteriófagos na disseminação da RAM é mais importante do que se imaginava (Von Wintersdorff *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2024a).

Mais recentemente, se descobriu um quarto tipo de HGT: a transferência de material genético via fusão celular mediada por vesículas nas membranas (MVs). Em bactérias Gram-positivas essas vesículas são chamadas simplesmente de MVs, mas em Gram-negativas elas se localizam na membrana externa e, portanto, são chamadas de OMVs. Já se observou envolvimento dessas estruturas na transferência de ARGs entre bactérias filogeneticamente distantes, como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella enterica*. Esse mecanismo pode ser chamado de vesidação e ocorre rapidamente, geralmente em menos de três horas. OMVs são estruturas naturalmente formadas pelas bactérias capazes de proteger o DNA de exonucleases, congelamento e degradação por calor, podendo trazer descobertas importantes sobre HGT em biofilmes e ambientes extremos. Por ser uma descoberta muito recente, ainda existem muitas lacunas de conhecimento nos mecanismos e fatores que induzem a vesidação, mas se considerando que já se encontraram plasmídeos, fragmentos de DNA cromossômico e de fagos em OMVs, é seguro afirmar que essas estruturas celulares possuem um papel importante na HGT (Michaelis; Grohmann, 2023; Liu *et al.*, 2024a).

Outro método de HGT descoberto recentemente é através de nanotubos. Esse mecanismo foi descoberto em *Bacillus subtilis* e consiste em uma estrutura extracelular membranosa composta por uma bicamada lipídica formando um lúmen, permitindo assim a troca de diversas moléculas como proteínas e DNA, inclusive plasmídeos não conjugativos, entre bactérias em contato próximo (Michaelis; Grohmann, 2023; Molina-Santiago; Bernal, 2023). Estruturalmente, os nanotubos se assemelham com as MVs. Essas estruturas são formadas pela enzima LytC, responsável por remodelar a parede celular, e seu ativador LytB, permitindo assim a extrusão do nanotubo do doador em direção ao recipiente (Boopathi; Liu; Jia, 2021). Os nanotubos funcionam de forma semelhante aos *pili* conjugativos, mas se utilizam de um mecanismo muito mais simples do que o T4SS. Por permitir a troca de material genético entre bactérias próximas, os nanotubos podem atuar também na disseminação de ARGs hereditários e não hereditários (Liu; Thomsen; Olsen, 2022).

3.3 Novas fontes de antibióticos

Durante a Era de Ouro dos antibióticos (anos 1940 a 1960), foram descobertas 16 classes de antibióticos. Em contrapartida, nos 50 anos seguintes, só se descobriram mais 6 classes. A última classe de drogas voltada especificamente para bactérias Gram-negativas foi o monobactâmico aztreonam, em 1986. Essa falta de novos produtos, somada ao avanço desenfreado da RAM, acende a necessidade do investimento na prospecção de novas drogas.

Hoje, existem 22 classes de drogas aprovadas para uso sistêmico, sendo 4 sintéticas, 17 derivadas de produtos naturais e 1, os nitro-heterocíclicos, com um composto sintético e um natural. Os mecanismos gerais de ação desses antimicrobianos são pela interferência da síntese da parede celular, de proteínas, de DNA, do metabolismo do ácido fólico e da síntese e integridade da membrana celular (Walesch *et al.*, 2023).

O principal problema para o desenvolvimento de novos antimicrobianos é a falta de novos alvos que permitam toxicidade seletiva das drogas contra as bactérias, visto que os mais óbvios já são utilizados. Dessa forma, ficamos à mercê da sorte dos cientistas de acharem novos produtos naturais, e sua criatividade para sintetizar novas drogas. Além disso, a maior parte dessas pesquisas ocorre em pequenas empresas de biotecnologia e em universidades, visto que as grandes indústrias farmacêuticas não têm interesse em investir em prospecções dessa natureza. Como já foi discutido, novos antibióticos tendem a perder sua eficácia em poucos anos, portanto as *big pharmas* não têm tanta perspectiva de lucro com essas drogas. Por isso, os investimentos se voltam para tratamentos contra câncer e doenças neurológicas, psicológicas, musculoesqueléticas e cardiovasculares, cujos medicamentos costumam ser utilizados cronicamente e/ou comercializados a preços muito altos (Moellering Jr., 2011).

A maior parte dos novos antibióticos são apenas derivados de estruturas químicas já conhecidas, e menos de 25% dos antimicrobianos atualmente em desenvolvimento representam uma nova classe ou um novo mecanismo de ação, infelizmente nenhum sendo eficaz contra cepas ESKAPE ou outros patógenos críticos da OMS (Miethke *et al.*, 2021). Além disso, as novas moléculas descobertas e estudadas raramente são *drug-like*, ou seja, elas não possuem as características físico-químicas e não reagem da forma ideal para serem aplicadas em novas terapias orais. Em outras palavras, há muitas drogas capazes de matar bactérias, mas transformá-las em medicamentos que o corpo humano possa usar é o que torna a descoberta de novos antibióticos tão desafiadora (Frei *et al.*, 2020).

A necessidade por inovação é evidenciada também pela resistência cruzada. Ao se descobrir novos antimicrobianos das mesmas classes já existentes, essas drogas já se encontram sujeitas a mecanismos de resistência pré-existentes. Por isso, o fenômeno da resistência cruzada já é levado em consideração ao se modificar antibióticos existentes para criar novas drogas. Outra estratégia é a terapia combinada de drogas sinérgicas a fim de superar RAM, aumentar o espectro de ação dos antimicrobianos e reduzir efeitos colaterais. Também tem se utilizado a co-encapsulação de diversas drogas em nanosistemas com a mesma finalidade (Terreni; Taccani; Pregnolato, 2021).

Antibióticos podem se originar de produtos naturais ou por síntese química. A descoberta a partir de produtos naturais está associada a etapas de purificação e caracterização do produto, como ocorreu com as penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, aminoglicosídeos e outros. Os antibióticos naturais costumam ser moléculas grandes e complexas, com vários grupos funcionais, diminuindo sua biodisponibilidade e requerendo síntese via fermentação. Apesar disso, essas moléculas podem servir de *scaffolds* para síntese de novas gerações de drogas semi-sintéticas que não apresentem esses problemas. Em se falando de antibióticos sintéticos, eles têm origem na síntese química de agentes cuja estrutura não pode ser encontrada na natureza, como as sulfonamidas, conhecidas popularmente como sulfas (Walsh, 2003). A modificação química de antibióticos já conhecidos tem como objetivo melhorar sua estabilidade, biodisponibilidade, tolerância no organismo e aumentar seu espectro de ação. As novas drogas sintetizadas com esses fins conseguem desviar dos mecanismos de resistência a antibióticos de gerações mais antigas, mas a falta de novos mecanismos de ação frequentemente leva à rápida resistência cruzada a essas drogas (Walesch *et al.*, 2023).

Além das drogas tradicionais, tem se buscado atividades antimicrobianas em diversas outras fontes. Uma delas são as nanopartículas de metais (MNPs), que apresentam atividade até mesmo contra os patógenos ESKAPE. Nanopartículas de prata, por exemplo, conseguem perturbar a permeabilidade da membrana celular, interagir com compostos contendo enxofre e fósforo, inclusive DNA, e liberar íons de prata que atuam como antibacterianos. Nanopartículas de ouro, óxido de zinco e dióxido de titânio também são estudadas nesse contexto. Contudo, para viabilizar a aplicação clínica de MNPs, é necessário melhorar suas propriedades físico-químicas, seu perfil farmacocinético e se estudar os efeitos da exposição a longo prazo em humanos (León-Buitimea *et al.*, 2020).

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) também têm atraído cada vez mais atenção como uma possível nova classe de antimicrobianos. Essas pequenas proteínas possuem um número variável de aminoácidos e, em seres como insetos e plantas, que não possuem um sistema imunológico adaptativo, os AMPs constituem sua principal defesa contra microrganismos patogênicos. Bactérias e outros microrganismos também conseguem sintetizar AMPs com o objetivo de se proteger de outros microrganismos em disputas por um nicho ecológico, e atualmente AMPs sintéticos também estão tendo cada vez mais relevância. AMPs costumam apresentar uma potente atividade mesmo em concentrações na ordem de micromolar, promovendo uma rápida morte bacteriana e baixa pressão de seleção. Essas moléculas agem primariamente na membrana celular, rompendo-a e formando poros que permitem a entrada dos AMPs na célula e consequentemente o colapso do potencial de membrana, alteração na

permeabilidade e extravasamento de metabólitos. Uma vez dentro da bactéria, essas pequenas proteínas podem agir também na interrupção de diversos processos intracelulares como transcrição, tradução, síntese proteica e formação da parede celular. Por agir diretamente nos componentes lipídicos da membrana celular bacteriana, a maioria dos AMPs apresenta uma atividade de amplo espectro. Apesar de todo esse potencial, a digestão proteolítica em diversos fluidos corporais ainda é um importante fator limitante para a aplicação sistêmica de AMPs, devido à perda de estabilidade e do perfil farmacocinético (Browne *et al.*, 2020; León-Buitimea *et al.*, 2020).

A fim de melhorar seu *fitness* na natureza, muitos microrganismos se especializam em produzir antibióticos para inibir o crescimento de seus competidores. Uma vez que esses microrganismos evoluem juntos, essas moléculas também devem estar em constante evolução quanto à diversidade estrutural, penetração da parede celular, atividade celular e seletividade a fim de superar a resistência a antimicrobianos dos competidores. Dessa forma, ensaios fenotípicos ainda apresentam muita relevância na busca por novas moléculas bioativas (Walesch *et al.*, 2023).

Em 1937, Selman Waksman percebeu que actinobactérias isoladas do solo eram capazes de inibir o crescimento de outras bactérias, e que esses mecanismos, evoluídos a partir da competição, poderiam servir como base conceitual para uma plataforma de *screening* de microrganismos produtores de moléculas antimicrobianas. Desde então, a Plataforma Waksman já foi utilizada para fazer bioprospecção em mais de 10 mil cepas de diferentes microrganismos, mas os principais produtores de antibióticos ainda são as actinobactérias, das quais se originam mais de 90% dos antibióticos em uso clínico (Cunha; Fonseca; Calado, 2019).

Alguns autores defendem a tese de que não há motivos para se retornar à natureza para prospectar antibióticos de origem microbiana. Contudo, menos de 1% das bactérias são cultiváveis, comprovando que ainda há muito a se explorar nesse domínio. Um grande problema ao se recorrer a essas técnicas clássicas é a alta taxa de *rediscovery* de moléculas, onde extratos bioativos obtidos ao se cultivar essas bactérias apresentam compostos que já eram conhecidos, daí a necessidade de se mudar o foco da bioprospecção. Em contrapartida, nem todo filo possui o mesmo potencial de biossíntese do filo Actinobacteria, que apresenta um genoma grande e é capaz de prosperar em diversos ambientes, comprovando sua riqueza de metabólitos e justificando a insistência em se buscar novas drogas nesse filo (Hegemann *et al.*, 2023).

3.4 Actinobactérias: características gerais

O filo Actinobacteria é um dos grupos bacterianos mais abundantes e importantes econômica e biotecnologicamente. Essas bactérias Gram-positivas têm o genoma rico em guanina e citosina, podendo ter até 11,9 megabases e podem variar desde organismos unicelulares anaeróbicos até filamentosos, aeróbicos e produtores de esporos. Devido à sua morfologia diversa, não se sabia onde classificar esses microrganismos, se junto aos fungos ou às bactérias, pois apresentam micélio e cadeias de conídios semelhantes àqueles dos fungos imperfeitos. Contudo, com um melhor entendimento de suas características celulares, se confirmou que a estrutura celular é idêntica à de procariotos e que, portanto, actinobactérias são de fato bactérias (Boubekri *et al.*, 2022). Essa incerteza foi expressa na nomenclatura desses microrganismos. Seu antigo nome (apesar de ainda muito utilizado) “actinomicetos” é uma junção das palavras gregas *aktis* (raio, pela presença de micélio radial bem desenvolvido na forma de círculos concêntricos) e *mykes* (fungo) (Hazarika; Thakur, 2020).

Actinobactérias estão dentre as bactérias envolvidas na colonização da terra firme bilhões de anos atrás, por isso esse filo está intrinsecamente envolvido com o funcionamento adequado dos ecossistemas. Essa longa história evolutiva permitiu que as actinobactérias desenvolvessem uma diversidade de morfologias e funções, diferindo bastante tanto entre si quanto entre as demais bactérias. Actinobactérias podem assumir formas cocoides, bacilares, cocobacilares, de hifas ramificadas ou fragmentadas com esporos, ou micélios altamente diferenciados e complexos. Quanto às funções, podem atuar como biorremediadores, probióticos para humanos e animais, produtores de enzimas hidrolíticas e de metabólitos de importância clínica (antifúngicos, antivirais, antiparasíticos, imunossupressores, antioxidantes, quimioterápicos e agentes anticâncer, neuroprotetores, anti-acne, anti-envelhecimento e clareadores de pele, e principalmente antibióticos). Apesar disso, algumas espécies de actinobactérias podem atuar como patógenos de humanos, de animais e de vegetais (Law *et al.*, 2020; Hazarika; Thakur, 2020).

A identificação de actinobactérias levando em consideração somente o clássico sequenciamento do gene 16S rRNA pode levar a ambiguidades entre espécies e gêneros muito próximos. Por isso, deve-se observar também a quimiotaxonomia, que diz respeito a características bioquímicas como composição da parede celular (que varia entre subordens e abrange isomeria do aminoácido ácido 2,6-diaminopimélico ou DAP, identidade do aminoácido na posição 3 da cadeia lateral tetrapeptídica, presença ou ausência de glicina nas

pontes interpeptídicas, composição glicídica do peptideoglicano, etc.), distribuição de ácidos graxos dentro da célula (cujo perfil da actinobactéria quando àqueles que possuem entre 10 e 24 carbonos pode a dividir em três grupos) e composição fosfolipídica da membrana (onde alguns marcadores podem dividir as actinobactérias em cinco grupos), e também a morfologia a nível microscópico. As principais características observadas são ausência/presença de micélio aéreo e de substrato, cor do micélio, produção de pigmentos melanoides difusíveis, e a organização e morfologia dos esporos (Barka *et al.*, 2016).

A ânsia de se isolar novas actinobactérias devido ao seu potencial biotecnológico levou a estudos buscando-as em uma variedade de habitats. Devido à ubiquidade das actinobactérias, quase sempre essas tentativas têm sido frutíferas, seja em ambientes terrestres ou aquáticos. O local mais estudado na prospecção de actinobactérias é indiscutivelmente o solo, mas é possível encontrá-las em fontes de água doce, oceanos (tanto em baixas profundidades próximas à praia quanto a grandes profundidades), em associação com plantas e animais, sempre exercendo diversas funções ecológicas. Devido à sua constante interação com outros organismos e seu papel ativo na ciclagem de nutrientes, as actinobactérias desenvolveram um grande potencial biosintético de metabólitos secundários (Jose; Maharshi; Jha, 2021). Além disso, esse potencial também pode ser atribuído às complexas mudanças fisiológicas e seu ciclo de vida multicelular, além do grande genoma observado principalmente em *Streptomyces*. A complexidade das actinobactérias pode explicar sua capacidade de sobreviver também em ambientes extremos como geleiras, montanhas, cavernas, desertos, fontes termais e manguezais (Law *et al.*, 2020).

Uma importante abordagem a ser considerada é a busca pelo isolamento de actinobactérias raras e seus gêneros desconhecidos e menos estudados em locais inusitados. Apesar de serem chamadas de raras, estudos moleculares já comprovaram que essas bactérias são abundantes em diversos habitats, mas que ainda não se descobriram as condições e técnicas necessárias para se isolar e cultivá-las (Ezeobiora *et al.*, 2022).

Diversos estudos já utilizaram técnicas de *metabarcoding* para analisar o perfil microbiano de diferentes habitats, e alguns desses estudos se focam em actinobactérias. A análise desses resultados nos confirma que o gênero *Streptomyces* não é o mais abundante na natureza. Por exemplo, Ribeiro e colaboradores (2023) analisaram molecularmente sedimentos obtidos a profundidades entre 1072m e 3199m no Oceano Atlântico próximo às costas de Azores e Madeira, em Portugal. Nesse estudo, os gêneros de actinobactéria com maior abundância absoluta foram Sva0996 marine group, *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Gardnerella*, *Microbacterium* e *Micrococcus*, com *Streptomyces* sendo praticamente

inexistente. Já no Oceano Antártico, próximo à Índia, Manikkam e colaboradores (2024) fizeram uma análise semelhante com sedimentos obtidos entre 405m e 600m de profundidade. Nessas amostras, as ordens mais abundantes foram Micrococcales e Pseudonocardiales, e os gêneros com maior abundância relativa foram *Saccharopolyspora*, *Ilumatobacter*, *Glaciihabitans*, Sva0996 marine group e *Streptomyces*, que dessa vez aparece dentre os três mais abundantes, porém em uma frequência bem menor que os dois maiores.

Já em solos, ambiente conhecido pela abundância de *Streptomyces*, Bandeira e colaboradores (2024) mostraram que não é tão simples assim. Em uma análise de *metabarcoding* de amostras de solo obtidas a 10cm de profundidade de uma área de preservação no Piauí, no Brasil, os pesquisadores encontraram predominantemente os gêneros *Mycobacterium*, *Actinoallomurus*, *Nocardioides*, *Pseudonocardia* e *Streptomyces*. Porém, mais de 70% das OTUs encontradas pertencem a gêneros desconhecidos, o que evidencia que actinobactérias “raras” podem ser abundantes em diversos habitats, daí a necessidade de se desenvolver novas técnicas de cultivo para buscar novas biomoléculas em novos gêneros de bactérias de ambientes inexplorados (Ezeobiora *et al.*, 2022).

É impossível se mencionar ambientes inexplorados sem falar sobre os oceanos, grande fonte de potencial biotecnológico. A primeira actinobactéria marinha foi descoberta apenas em 1984, o que evidencia a defasagem dessa área em comparação a outras bactérias. Nos oceanos, actinobactérias já foram encontradas em simbiose com uma variedade de animais, tanto vertebrados quanto invertebrados, e essas interações levam à evolução de rotas metabólicas únicas. Em geral, as características metabólicas e genéticas dos microrganismos marinhos são muito diferentes daquelas de seus parentes terrestres. Essa peculiaridade os torna um campo de estudo extremamente interessante, especialmente considerando, novamente, que as fontes de metabólitos de actinobactérias terrestres já foram exaustivamente estudadas. Em contrapartida, os estudos com actinobactérias marinhas estão apenas no começo. Seus compostos bioativos só estão sendo explorados e caracterizados há pouco tempo, corroborando para que seu potencial biotecnológico seja uma empolgante e esperançosa incógnita (Jagannathan *et al.*, 2021).

3.5 Ciclo de vida das actinobactérias

Devido às diferentes morfologias presentes nas actinobactérias, é possível observar vários ciclos de vida diferentes. Contudo, por ser o gênero de maior destaque e importância econômica, o ciclo de vida de *Streptomyces* é o mais estudado e se inicia quando um esporo

dormente encontra um local com nutrientes o suficiente, e a partir dele emergem tubos germinativos. Esses tubos crescem por extensão das extremidades, e podem se ramificar lateralmente em intervalos aleatórios. Esse ciclo contínuo de crescimento e ramificação leva ao desenvolvimento de uma complexa rede de hifas chamada de micélio vegetativo ou micélio reverso, que irá fixar a bactéria no substrato. Durante o amadurecimento dessas estruturas, paredes transversais são formadas dentro das hifas, sendo irregulares em forma, aparência, espessura, frequência e localização. Essas paredes não separam completamente os compartimentos formados, devido à presença de canais através das paredes transversais que permitem a comunicação e transporte de substâncias entre compartimentos, formando assim uma estrutura bacteriana multicelular (Hamed; Poorinmohammad; Papiran, 2017; Jones; Elliot, 2018).

Quando os nutrientes se tornam escassos, principalmente nitrogênio, carbono e GTP, hifas envolvidas em proteínas hidrofóbicas quebram a tensão superficial do meio e crescem por extensão de extremidades em direção ao ar para longe do micélio vegetativo, cobrindo toda a superfície da colônia e formando o micélio aéreo. Esse processo é regulado pela família de genes *bld*, assim chamada pois mutantes sem esses genes não formam micélio aéreo (*bld* vem de “bald”, careca em inglês). Quando há crescimento suficiente, ele é interrompido para dar início à esporulação. As hifas do micélio aéreo também são septadas, mas diferente das paredes transversais do micélio vegetativo, as células são separadas completamente por septos de esporulação distribuídos de forma simétrica e altamente controlada ao longo da hifa, formando cadeias de presporos com o mesmo genoma em um processo denominado divisão celular esporulação-específica. Depois da septação do micélio aéreo, a maturação dos esporos se inicia. Uma grossa parede é formada na superfície interior do presporo, e alguns cuidados são tomados para proteção do DNA. Por fim, é produzido um pigmento para proteção dos esporos. A transição do crescimento do micélio aéreo para a esporulação é controlada pela família de genes *whi*. De forma semelhante aos *bld*, *whi* têm esse nome pois seus mutantes não produzem pigmentos, formando esporos brancos (*whi* vem de “white”, branco em inglês). Esses esporos maduros podem se espalhar, dar origem a novos tubos de germinação e reiniciar o ciclo (Hamed; Poorinmohammad; Papiran, 2017; Jones; Elliot, 2018).

Assim como a maioria dos microrganismos filamentosos, *Streptomyces* são sésseis, por isso se utilizam da esporulação para conquistar novos ambientes. Como esse processo é energeticamente oneroso e ocorre principalmente em condições de falta de nutrientes, a actinobactéria sofre morte celular programada (PCD) de determinadas estruturas para se fornecer aminoácidos, aminoaçúcares, nucleotídeos, lipídeos e outros *building blocks*

necessários para a esporulação. Como esses nutrientes são liberados no meio, eles atraem muitos microrganismos competidores, por isso é nessa etapa que ocorre a maior produção de antibióticos pelas actinobactérias, fenômeno que será discutido adiante. O ciclo de vida de *Streptomyces* tem basicamente duas etapas de PCD: inicialmente, o micélio vegetativo gerado logo após a germinação do esporo é lisado para originar mais micélio vegetativo; por fim, o micélio vegetativo é lisado para originar o micélio aéreo. Esse processo também é regulado pelos genes *bld* (Barka *et al.*, 2016).

Mais recentemente, descobriu-se que em situações ambientais específicas como presença de leveduras, alta concentração de aminoácidos e baixa disponibilidade de glicose, *Streptomyces* podem abandonar seu estilo de vida clássico e adotar um modo de crescimento exploratório. Isso ocorre pelo rápido crescimento horizontal de micélio semelhante ao vegetativo sobre uma superfície sólida e é acompanhado pela emissão de trimetilamina (TMA). Essa molécula volátil promove a alcalinização do meio, tornando a actinobactéria mais competitiva pela diminuição da biodisponibilidade de ferro (remediada pela produção de sideróforos), inibindo outros microrganismos (pela síntese de antibióticos e limitação de ferro) e sinalizando para outras colônias iniciarem também a exploração. *Streptomyces venezuelae* tem sido estudada como modelo para esse fenômeno, e observou-se que no ciclo de exploração ocorre um aumento na expressão de um *operon* relacionado ao catabolismo do glicerol, molécula que pode ser produzida por leveduras. Em ensaios *in vitro*, a suplementação de glicerol é capaz de estimular dramaticamente o ciclo de exploração e a síntese de um pigmento laranja vibrante chamado de coproporfirina, cujo acúmulo é fruto da desregulação da síntese de grupos heme causada pela falta de ferro. Além disso, colônias exploratórias de *S. venezuelae* cultivadas em meio suplementado com glicerol apresentam atividade antimicrobiana que não é observada em colônias exploratórias tradicionais (Shepherdson; Elliot, 2022; Shepherdson *et al.*, 2022).

3.6 Actinobactérias como fonte de antibióticos e outros bioprodutos

Microrganismos estão presentes em todos os habitats do mundo, apresentando imensa diversidade fisiológica e funcional. Mínimas mudanças no ambiente, assim como competição por sobrevivência, levam as bactérias a evoluírem e desenvolver mecanismos inusitados de defesa, ataque e sinalização para aumentar seu *fitness*. Em ambientes extremos, genes tidos como “não essenciais” são descartados a fim de melhorar a eficiência do organismo, levando ao aparecimento de cepas com maiores capacidades metabólicas. Essas adaptações envolvem

mudanças em mecanismos fisiológicos e produção de compostos químicos únicos (Siro *et al.*, 2022; Xie; Pathom-aree, 2021).

Metabólitos primários são aqueles obrigatórios para o crescimento dos organismos, que os permitem manter a função celular e sobrevivência do indivíduo, agindo diretamente em rotas anabólicas e catabólicas. Já metabólitos secundários são compostos orgânicos sintetizados próximo ao fim da fase estacionária e que não são necessários para o crescimento padrão dos organismos, mas lhe concedem vantagens ao atuar na inibição, comunicação, aquisição de nutrientes e outros tipos de associações ecológicas com organismos próximos. Dentre os metabólitos secundários produzidos por actinobactérias, é possível citar alcaloides, antibióticos (beta-lactâmicos, sulfonamidas, aminoglicosídeos, etc.), glicopeptídeos, sideróforos, moléculas relacionadas ao *quorum sensing*, imunossuppressores, enzimas hidrolíticas (proteases, celulasas, lipases, xilanases, pectinases, amilases, queratinases, etc.), dentre outros (Al-shaibani *et al.*, 2021).

Os metabólitos secundários costumam ser codificados em *clusters* de genes biosintéticos (*biosynthetic gene clusters*, BGCs), que são grupos de genes localizados em proximidade e que podem variar muito entre espécies. Ainda não é possível se estudar completamente o potencial biosintético das actinobactérias, pois muitos BGCs só são ativados sob situações muito específicas, como interações interespecies como as que ocorrem em seu habitat natural. Utilizando o exemplo dos antibióticos, sua síntese só é iniciada a partir da detecção de moléculas sinalizadoras produzidas por competidores próximos, ou em situação de falta de nutrientes. Actinobactérias são os produtores mais diversos de metabólitos secundários, e no caso dos antibióticos, eles podem atuar tanto como mecanismos de defesa em interações interespecíficas quanto como medida auto-tóxica para controlar o crescimento celular. Por isso, estuda-se muito o co-cultivo de actinobactérias com outros microrganismos a fim de tentar simular o ambiente natural competitivo e expressar BGCs silenciosos. Contudo, as mesmas condições que levam à expressão de um BGC podem levar ao silenciamento de outros. Uma possível alternativa para a indústria seria a expressão heteróloga desses BGCs, visto que as tecnologias de sequenciamento de genoma inteiro nos permitem conhecer a localização genômica do BGC, mas ainda não é possível descobrir com facilidade como expressá-los naturalmente (Ngamcharungchit *et al.*, 2023; Jagannathan *et al.*, 2021; Lee; Goh; Chan, 2020).

O processo de descoberta de novos medicamentos de origem microbiana segue uma rota geral e a primeira etapa consiste em definir a correlação entre cepa, metabólito e bioatividade, etapa onde muitas pesquisas são suspensas devido ao *rediscovery* de moléculas.

Além da óbvia falta de novas drogas resultantes desse fenômeno, a indústria acaba ficando sem novos *scaffolds* para produção de drogas sintéticas ou semi-sintéticas. Isso, junto ao reposicionamento de fármacos e a disponibilidade de antibióticos intercambiáveis levou à saturação do mercado e o consequente corte de gastos nos programas de prospecção industrial de moléculas actinobacterianas. Esse corte é feito porque o processo da descoberta à comercialização de drogas a base de NPs leva entre 10 a 12 anos e demanda um investimento de bilhões de dólares por molécula. Por isso, de 10000 moléculas com atividade *in vitro*, apenas 5 entram na fase de ensaios clínicos e 1 é comercializada. Ao se considerar as actinobactérias raras, elas correspondem a 10% das actinobactérias isoladas, porém a mais de 25% das moléculas bioativas produzidas pelo filo, o que evidencia as vantagens de se utilizar métodos alternativos de isolamento e de cultivo para se obter espécies raras. O descobrimento de mais moléculas, assim como novas espécies ou espécies menos estudadas e caracterizadas pode aumentar a eficiência e reduzir o custo total desse processo (Ezeobiora *et al.*, 2022; Ossai *et al.*, 2022; González-Salazar *et al.*, 2023).

Por definição, antibióticos são moléculas orgânicas de baixo peso molecular que, em pequenas concentrações, são capazes de impedir o crescimento ou até matar microrganismos. Cerca de 75% dos antibióticos conhecidos são sintetizados por actinobactérias, exibindo atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os diversos pigmentos (azuis, violetas, vermelhos, rosas, marrons, etc.) produzidos por essas bactérias também podem apresentar atividade antimicrobiana e costumam ser seguros para a utilização humana (Selim; Abdelhamid; Mohamed, 2021). O catabolismo da glicose, de ácidos graxos e de proteínas costumam gerar precursores para a síntese de antibióticos, mas moléculas como malonil-CoA, aminoácidos não proteínogênicos e terpenoides também podem atuar como precursores, dependendo do tipo do antibiótico. Geralmente, a síntese de antibióticos é um processo oneroso e envolve a utilização de NADPH. Por exemplo, antibióticos como nistatina, jadomicina e tetraciclina, assim como seus derivados, usam diferentes quantidades de acetil-CoA, malonil-CoA e NADPH em sua rota biosintética, enquanto a cefalosporina utiliza os aminopácidos L-cisteína, L-valina e L-2-aminoácido (Salwan; Sharma, 2020).

Streptomyces coelicolor é usada como modelo para estudo dos mecanismos envolvidos na regulação da síntese de antibióticos. Quando o genoma dessa bactéria foi sequenciado, foram encontrados mais de 20 BGCs para a produção de metabólitos secundários, dentre eles os antibióticos actinorodina (Act), undecilprodigiosina, antibiótico cálcio-dependente (Cda) e metienomicina. Com o passar do tempo, foram encontrados *Streptomyces* com cada vez mais BGCs, com alguns tendo mais de 50 BGCs, levando à

conclusão de que a produção prolífica de antibióticos é a norma, e não a exceção (Barka *et al.*, 2016). Por exemplo, *Streptomyces rochei* 7434AN4 possui pelo menos 35 BGCs, codificando lancamicina, lancacidina, pentamicina, etc. Já *Amycolaptosis mediterranei*, produtor de vancomicina, possui 25 BGCs, cuja maioria ainda não foi caracterizado. Em um estudo com 40 espécies de *Micromonospora*, obteve-se uma média de 20 BGCs por isolado, o que apoia a hipótese mencionada (Ossai *et al.*, 2022).

A síntese de antibióticos está relacionada temporalmente com o crescimento e desenvolvimento das actinobactérias. Quando ocorre a PCD durante o processo de diferenciação, os nutrientes do micélio vegetativo são liberados no meio e irão atrair bactérias saprofíticas móveis. Como forma de defesa, a actinobactéria sintetiza e libera os antibióticos, que irão tanto proteger os nutrientes quanto gerar mais nutrientes pela morte dos oportunistas. Dessa forma, fatores ambientais e fisiológicos estão envolvidos na regulação da síntese dessas moléculas tão onerosas para se produzir, que ocorre em vários níveis transcricionais e traducionais (Van Bergeijk *et al.*, 2020).

O sinal para estimular a esporulação e a síntese de antibióticos deve ser inconfundível, e a N-acetilglicosamina (GlcNAc) assume esse papel de elicitor global. Essa molécula se encontra na parede celular e é uma fonte favorável de carbono e nitrogênio. Em situações de escassez de nutrientes, ocorre a PCD do micélio vegetativo para promover a esporulação. A degradação da parede celular libera GlcNAc no meio, que sinalizará a necessidade de acelerar o desenvolvimento e sintetizar antibióticos, visto que essa molécula indica estresse nutricional. Molecularmente falando, GlcNAc entra na célula como GlcNAc-6P, logo sendo convertido para GlcN-6P. Essa molécula atua como ligante do regulador global DasR, e essa ligação leva à inativação do repressor DasR que irá resultar na expressão de diversos ativadores de BGCs de antibióticos como Cda, Act e coelomicina P1 (Cpk). Alternativamente, em meios ricos em nutrientes, a presença de GlcNAc bloqueia tanto o desenvolvimento do micélio aéreo quanto a produção de antibióticos, pois essa molécula também pode ser derivada da quitina, indicando abundância de nutrientes. Em resumo, GlcNAc é uma molécula sinalizadora na natureza tanto em períodos de fome (sinalizando autólise da parede celular da actinobactéria e necessidade de esporulação) quanto em períodos de abundância de nutrientes (visto que é derivado da quitina, e, portanto, estimulando o crescimento). Ao imitar esses sinais *in vitro* em experimentos de co-cultura, é possível expressar BGCs que em outras condições seriam impossíveis de expressar (Barka *et al.*, 2016; Van Bergeijk *et al.*, 2020).

Em laboratório, a busca por novos antibióticos se inicia pela busca por actinobactérias raras, a fim de tentar driblar o *rediscovery*, e então envolve alguns fatores na otimização das

condições de cultura. A densidade celular é importante para se atingir a melhor taxa de produção de antibióticos, assim como o pH, que deve estar entre 6 e 7, e o período de incubação, que deve ser de 6 a 8 dias, dependendo da cepa. A fonte de carbono também influencia muito a produção de metabólitos, portanto a escolha entre açúcares como amido, glicose, maltose, frutose, etc., assim como a fonte de nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de amônio, peptona, extrato de levedura, etc.) são fundamentais (Amin *et al.*, 2020).

Com tudo isso em mente, apesar de já serem tão estudadas, as actinobactérias continuam sendo cruciais na busca por novos antibióticos devido à sua alta capacidade de produzir metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. No entanto, a alta taxa de *rediscovery* de moléculas em ambientes já muito explorados, como o solo, torna necessário mudar o foco para locais menos estudados. Acredita-se que a busca por antibióticos em ambientes e espécies incomuns de actinobactérias seja promissora no combate à RAM. Embora a síntese química tenha evoluído, produtos naturais ainda são a principal fonte de novas biomoléculas com atividade antimicrobiana. Por isso, o desenvolvimento de novos métodos de isolamento em novos habitats é fundamental para encontrar actinobactérias raras que produzam antibióticos com novas estruturas químicas, capazes de superar os mecanismos de resistência bacteriana (Selim; Abdelhamid; Mohamed, 2021; Ezeobiora *et al.*, 2022).

Daí vem a importância das actinobactérias raras, que ao contrário do que seu nome sugere, não tem relação com sua abundância na natureza, e sim com a quantidade de estudos sobre elas e frequência de isolamento. Todas as bactérias não pertencentes ao gênero *Streptomyces* podem ser abraçadas por essa nomenclatura. Actinobactérias raras já foram isoladas de várias fontes, como solo, águas doces, oceanos, animais marinhos e terrestres, sedimentos marinhos, raízes de árvores, etc (Parra *et al.*, 2023). Nas últimas décadas, pesquisas promissoras com actinobactérias raras como *Micromonospora*, *Microbacterium*, *Jishengella*, *Salinispora* e *Nocardiopsis* têm levado à descoberta de novas moléculas bioativas, atestando o potencial desse grupo bacteriano como fonte importante de novas drogas (Hui *et al.*, 2021).

Cerca de 80% dos antibióticos em uso clínico são produzidos por actinobactérias, em especial pelo gênero *Streptomyces*. De todos os metabólitos secundários conhecidos, 17% são produzidos por esse gênero, sendo a maioria de importância clínica (Hui *et al.*, 2021). Actinobactérias raras apresentam uma menor frequência de produção de bioprodutos, mas isso ocorre devido à sua baixa taxa de isolamento e à dificuldade de se atingir condições laboratoriais ideais para crescimento e produção de metabólitos. Contudo, actinobactérias raras têm apresentado a capacidade de sintetizar antibióticos diferentes do que seria esperado,

com *Mycobacterium* produzindo asucamicina e apramicina, *Amycolatopsis* produzindo rifamorfolinas e *Micromonospora*, o gênero de actinobactéria rara dominante em diversos habitats, produzindo gentamicina, retimicina, galtamicina B, etc (Hu *et al.* 2020).

3.7 Potencial biotecnológico de actinobactérias simbióticas

Desde que plantas e animais passaram a interagir intimamente com microrganismos, essa relação nunca foi interrompida. A simbiose, como é conhecida essa interação, pode tomar a forma de diferentes níveis de mutualismo onde ambos os organismos envolvidos se beneficiam, ou, mais raramente, de predação, onde apenas o simbiote se beneficia e o hospedeiro é prejudicado. O conjunto de hospedeiro e simbiote é chamado de holobionte, onde o microrganismo afeta o *fitness* do hospedeiro e vice-versa. Já o conjunto da informação genética do hospedeiro e de sua microbiota é chamado de hologenoma. Tanto mudanças no genoma do hospedeiro quanto do microbioma implicam em alterações no hologenoma, e essas mudanças podem ser transmitidas entre as gerações e impactar diretamente na evolução do holobionte (Rosenberg; Zilber-Rosenberg, 2011).

Desde o surgimento das teorias de que algumas organelas eucarióticas têm origem simbiótica, evidencia-se o valor da simbiose microbiana como motor de evolução, visto que é capaz de conferir novas características. Os microrganismos simbióticos de eucariotos costumam ter papéis muito bem definidos na nutrição, imunidade, desenvolvimento e reprodução do hospedeiro, sendo específicos para cada indivíduo e não são transientes, ou seja, aleatoriamente adquiridos do ambiente. A maior parte do maquinário celular e genético em eucariotos pertence a seus simbiontes microbianos, visto que, em humanos, por exemplo, para cada célula humana existem 10 células bacterianas e para cada gene humano existem 1000 genes bacterianos. Essa diversidade microbiana influencia a resposta imune do hospedeiro, que é forçada a evoluir constantemente em resposta aos simbiontes. Dessa forma, o hologenoma está em constante evolução (hóspede e hospedeiro em coevolução), principalmente se a mudança em um gera uma pressão de seleção no outro (Brucker; Bordenstein, 2012).

De forma geral, microrganismos simbióticos protegem seus hospedeiros de três formas: secretando compostos que inibem patógenos, ocupando os sítios de ligação do patógeno no hospedeiro ou ativando a resposta imune do hospedeiro contra patógenos. Adaptações co-evolucionárias levaram ao surgimento de actinobactérias simbióticas em diversos hospedeiros. Essas associações são vantajosas porque, ao passo que a bactéria obtém

abrigo e nutrientes (pela colonização do sistema digestório como simbioses ou comensais), ela pode atuar para melhorar a nutrição, desintoxicação e crescimento do hospedeiro, assim como produzir antibióticos para defendê-lo, suas larvas ou sua fonte de alimento. Consequentemente, as actinobactérias simbióticas se tornam interessantes de um ponto de vista biotecnológico, visto que seu potencial antimicrobiano é maior que a média (Anteneh; Franco, 2017; Ossai *et al.*, 2022).

Actinobactérias simbióticas apresentam uma linhagem filogenética diferente das demais, o que cria esperança da presença de BGCs para metabólitos poderosos e desconhecidos. Animais como formigas, vespas e outros insetos, assim como invertebrados marinhos apresentam simbiose com actinobactérias de destaque na produção de metabólitos (como *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Streptomyces* e *Saccharopolyspora*), porém a maior parte da pesquisa atualmente se volta para actinobactérias endofíticas (como *Frankia* e *Micromonospora*, que atuam na fixação de nitrogênio, produção de auxinas e inibição de fitopatógenos), subestimando outros habitats que podem representar fontes importantes de novos compostos bioativos (Ossai *et al.*, 2022; Al-shaibani *et al.* 2021; Seipke; Kaltenpoth; Hutchings, 2012).

Insetos são conhecidos por suas interações ativas com microrganismos em diversas partes de seu corpo, onde atuam na promoção do crescimento do hospedeiro ao fornecê-lo nutrientes que ele não consegue obter sozinho, em troca de proteção. A interação inseto-microrganismo mais estudada é a que ocorre entre *Pseudonocardia* e a formiga cortadeira (*Acromyrmex* sp.). Essas formigas cultivam jardins de fungos para se alimentarem, mas esses jardins frequentemente são afetados pelo fungo patogênico *Escovopsis*. Como forma de defesa, as actinobactérias que crescem na cutícula das formigas produzem antibióticos (dentigerumicina, produzida por *Pseudonocardia*, e candicidina, produzida por *Streptomyces*) que inibem o crescimento de *Escovopsis*, protegendo assim a fonte de alimento de seu hospedeiro. Em vespas, *Streptomyces* crescem em uma parte específica do corpo das fêmeas, onde produzem diversos antibióticos para proteger diretamente o hospedeiro (Anteneh; Franco, 2017).

Já em cupins, as actinobactérias agem de forma diferente. Ao contrário do que ocorre nas formigas cortadeiras, ao cooperar com cupins as actinobactérias se localizam principalmente nas células dos ninhos e não no inseto em si, fato confirmado por três motivos principais: como a matéria lignocelulósica atravessa o intestino do cupim muito rapidamente, não há tempo para que as enzimas microbianas ajam; as actinobactérias do intestino não inibem patógenos fúngicos, que atravessam o intestino e chegam ao jardim de fungos ilesos; e

sua abundância nos ninhos é muito superior do que no intestino do inseto. Ainda não se sabe ao certo o papel ecológico das actinobactérias nessa relação, visto que seu potencial antimicrobiano e lignocelulolítico não apresenta diferença significativa daquelas actinobactérias presentes no solo. Contudo, é seguro afirmar que a presença dessas bactérias nos ninhos dos cupins apresenta um saldo positivo para os insetos, visto que eles não as removem do ninho (Murphy *et al.*, 2021).

Actinobactérias também são bem representadas no microbioma de diversas espécies de corais, o que sugere que são membros importantes de seu microbioma. Dentre diversas atividades, a função preponderante das actinobactérias nessa relação é a degradação de moléculas recalcitrantes por meio de sua forte atividade enzimática, dessa forma tornando-as assimiláveis pelos corais e pelos seus simbiossiontes dinoflagelados. Além disso, a produção de antibióticos não pode ser ignorada, uma vez que as actinobactérias conseguem manter patógenos como *Vibrio coralliilyticus* em níveis seguros para os corais (Becerril-Espinosa *et al.*, 2023).

As esponjas são os animais multicelulares mais antigos da terra e podem ter até um terço de sua biomassa constituída por microrganismos, que atuam na ciclagem de nitrogênio, carbono, enxofre e fósforo, além de produzir metabólitos para proteger o hospedeiro de patógenos, predadores e *fouling* (Dat *et al.*, 2021). De um ponto de vista ecológico, não faz sentido microrganismos marinhos excretarem metabólitos, uma vez que essas moléculas são rapidamente lavadas pelo mar. Porém, como o interior das esponjas é um ambiente parcialmente fechado, a produção de metabólitos extracelulares microbianos é incentivada. Por serem animais filtradores, esse ambiente se torna altamente rico em nutrientes e consequentemente em microrganismos. As actinobactérias fazem parte dessa microbiota, atuando como simbiossiontes e exercendo funções como proteção contra predação (defesa química), estabilização do esqueleto do animal, translocação de metabólitos e nutrição (Baig *et al.*, 2021).

O corpo humano também abriga naturalmente uma diversidade de actinobactérias, onde a abundância de diferentes gêneros está diretamente ligada às condições de saúde do hospedeiro. Os mais comuns são *Corynebacterium*, presente na pele (pernas, orelhas, boca, nariz) e em mucosas, *Rothia* e *Actinomyces*, presentes na cavidade oral e *Bifidobacterium* no sistema gastrointestinal. A maioria dessas actinobactérias não são patogênicas e atuam no estímulo ao sistema imune e inibição de patógenos. Algumas exceções são patógenos oportunistas como *Corynebacterium diphtheria* e *Bifidobacterium dentium*. Alguns gêneros,

como *Nocardia* e *Mycobacterium*, são famosos por causar doenças em humanos (nocardiose e tuberculose, respectivamente) (Anteneh; Franco, 2017).

Em plantas, actinobactérias podem atuar tanto como saprófitos benéficos, quanto endossimbiontes e patógenos. Por apresentarem a morfologia filamentosa e esporulação, actinobactérias possuem a capacidade de colonizar raízes e penetrar nas células vegetais, a partir de onde os fenótipos endofíticos e patogênicos irão diferir. Como endofíticos, a principal ação das actinobactérias é a produção de auxina levando ao crescimento e desenvolvimento de raízes, o que melhora a absorção de nutrientes pelo hospedeiro. Além disso, a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos já foi comprovada *in vitro* e *in vivo*, e essa antibiose leva à supressão das doenças da planta. *Streptomyces* conseguem produzir metabólitos secundários com atividade antifúngica e quitinolítica, daí sua capacidade de inibir o crescimento dos fungos. Contudo, já foi observada a capacidade das actinobactérias promoverem também o crescimento de fungos rizosféricos, em especial aqueles que formam as ectomicorrizas, benéficas para a planta (Seipke; Kaltenpoth; Hutchings, 2011). Já *Frankia* atuam de forma diferente, uma vez que sua simbiose com a planta se dá pela formação de uma organela especial fruto da colonização da planta pela bactéria. As bactérias desse gênero se aloca em nódulos radiculares e possuem vesículas ricas na enzima nitrogenase, que fixa o nitrogênio atmosférico em amônia biodisponível para a planta (Anteneh; Franco, 2017).

Ao se observar todas essas relações ecológicas entre actinobactérias e diversos animais e plantas, se torna evidente o potencial dessas bactérias de sintetizar metabólitos que podem ser aproveitados biotecnologicamente, especialmente moléculas com atividade antimicrobiana. Essas moléculas, originalmente sintetizadas com intuito de proteger o hospedeiro, podem apresentar também inibição do crescimento de bactérias patogênicas humanas. Além disso, pela falta de estudos relacionados à atividade antimicrobiana de actinobactérias simbióticas cultiváveis, com destaque para simbiontes de animais marinhos, ainda podem existir muitos antibióticos novos com mecanismos de ação inéditos capazes de ajudar a humanidade no combate à RAM. Por isso, é preciso focar a pesquisa em ambientes inexplorados e em actinobactérias nunca antes isoladas.

3.8 Camarão-branco-do-pacífico e sua microbiota

Antes de adentrar nesse tópico, é importante esclarecer a questão da nomenclatura do camarão-branco-do-pacífico, que tanto é chamado de *Litopenaeus vannamei* quanto de *Penaeus vannamei* e foi brilhantemente detalhada por Figueredo *et al.*, 2023. Na verdade, essa

ambiguidade ocorre com todos os camarões do gênero *Penaeus*. O primeiro camarão pertencia ao gênero *Cancer* (*C. chinensis* Osbeck, 1765), mas esse gênero passou a abrigar as diferentes espécies de caranguejo descritas por Lineu. O táxon *Penaeus* (*Penaeus sensu lato* – *s.l.*) foi então descrito para abrigar sua *type species*, *Penaeus monodon*, que era a única espécie do gênero *Penaeus* (*Penaeus sensu stricto* – *s.s.*), único gênero do táxon *Penaeus*. Posteriormente, *C. chinensis*, *C. setiferus* e *C. kerathurus* foram transferidos para o gênero *Penaeus* e a família Penaeidae Rafinesque foi criada para abrigar essas espécies “remanejadas”. Desde então, dezenas de gêneros e espécies foram descritos, portanto o primeiro nome do camarão branco é *Penaeus vannamei*. Eventualmente, taxonomistas analisaram as características sexuais de várias espécies de peneídeos e concluíram que o gênero *Litopenaeus* ocupa uma posição muito mais primitiva que *Penaeus s.s.*, que é mais evoluído. Também foram observadas mais similaridades entre *Litopenaeus* e camarões de télico aberto do que com *Penaeus*, de télico fechado, o que indica que *Penaeus s.l.* não é um grupo monofilético e que não abrange *Litopenaeus*. Com isso, o uso do termo *Litopenaeus vannamei* foi crescendo constantemente até passar *P. vannamei* em 2001 e ultrapassar 80% das referências em 2016. Mais recentemente, com a publicação de estudos filogenéticos moleculares envolvendo o genoma mitocondrial dos 6 gêneros de *Penaeus s.l.*, se descobriu que a Identidade Média de Aminoácidos (AAI) entre essas espécies era de 93,4%, o que é ainda maior que a AAI entre outros decápodes de mesmos gêneros. Com isso, se confirma que *Penaeus s.l.* é sim monofilético e a nomenclatura original pode ser restaurada. Desde então, o uso da nomenclatura *Penaeus vannamei* tem tido cada vez mais relevância, mas ainda está longe de ser predominante. Portanto, por ser a nomenclatura mais correta e utilizada atualmente, ao longo desse trabalho o camarão branco será referido como *P. vannamei*.

Devido ao seu sabor, carne de boa qualidade, facilidade de preparar, baixo teor de gordura, alto teor de proteínas e métodos de cultivo bem compreendidos, *P. vannamei* (camarão-branco-do-pacífico) representa 80% da produção de camarões no mundo, com uma produção anual global de 58,1 milhões de toneladas que valem US\$ 26,7 bilhões. 83% da produção global de *P. vannamei* advém da aquicultura. Esse camarão é um animal eurialino, ou seja, suporta grandes variações de salinidade, e é cultivável em alta densidade tanto em água do mar quanto em água salobra devido a sua resistência a estresse e a doenças, crescimento rápido, baixo custo e alta rentabilidade (Amiin *et al.*, 2023; Chen *et al.* 2024; Li *et al.*, 2021b).

Quanto à alimentação, o camarão branco tem uma alta necessidade de proteínas, visto que prefere utilizá-las como fonte de energia do que carboidratos. Os açúcares, porém,

são muito importantes visto que são utilizados tanto como fonte de energia quanto como precursores para síntese de quitina e de ácidos nucleicos. Já os lipídeos, além de fonte de energia, servem também como precursores de hormônios esteroides, são parte estrutural e funcional das células, atuam como mediadores intercelulares e são vitais para o crescimento, maturação e produção de náuplios (Tzuc *et al.*, 2014).

Na região da América Latina e Caribe, o mercado de *P. vannamei* cresceu rapidamente, passando de poucos países na década de 90 (86.000 t e 25.000 ha) para 22 de 36 países nessa região sendo produtores significativos desse animal em 2017, totalizando mais de 766.000 t e 200.000 ha, crescimento de 20% ao ano. No Brasil, a produção de *P. vannamei* cresceu 33% entre 2019 e 2021 (passando de 90.000 t para 120.000 t) e é dominada por 75% de pequenos produtores (fazendas com < 2 ha) que praticam monocultura semi-intensiva em grandes tanques com baixa salinidade. Dos 20.000 ha utilizados para cultivo desse animal no Brasil, 98% (19.845 ha) ficam na região estuarina do Nordeste, em especial no Rio Grande do Norte e no Ceará. A produção nacional em 2019 excedeu 12 bilhões de animais na fase pós-larval vendidos principalmente para Estados Unidos e Europa a até US\$ 2,00 por milhar, mas desde então o consumo doméstico tem crescido. No Nordeste, os lucros de exportação de camarão já chegaram a ultrapassar US\$ 270 milhões, sendo a segunda maior atrás apenas da cana de açúcar e gerando entre 1,8 e 3,7 empregos por hectare (Valenti *et al.*, 2021; Lacerda *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

Dada a abundância de nutrientes no intestino e no trato digestório como um todo, é compreensível que os microrganismos se instalem nesse ambiente. Mesmo com esses nutrientes sendo destinados ao hospedeiro, eles também podem ser aproveitados pelos microrganismos, que podem estabelecer relações simbióticas de mutualismo, comensalismo e parasitismo, de acordo com o tipo de bactérias dominante no momento (Amiin *et al.*, 2023). Na última década, o estudo das comunidades microbianas que habitam esses canais alimentares de animais (microbiota) ganhou destaque. No caso dos camarões, a parte mais estudada desse sistema é o intestino, cujo microbioma atua como um órgão acessório metabolicamente ativo do sistema endócrino (assim como na maioria dos eucariotos) provendo novas rotas metabólicas para auxiliar na absorção de nutrientes, proteção contra patógenos, crescimento, sobrevivência, resposta imunológica, manutenção da homeostase e é influenciada pelo estado nutricional do animal, consumo de probióticos, estágio de desenvolvimento e condições físico-químicas da água. Apesar do papel fundamental da microbiota intestinal na saúde dos animais, ainda se sabe pouco quanto à imunidade intestinal e funções do microbioma de crustáceos quando comparado a humanos e insetos, visto que

ainda não se sabe, por exemplo, se a microbiota é controlada pelo camarão ou o oposto. O que se sabe é que muitas das funções do sistema digestório são, na verdade, exercidas pelo metabolismo de seu microbioma (Hembrom *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2018).

Pennaeus spp. possuem um complexo ciclo de vida com vários estágios, passando por ovos, larva (náuplio, protozoa e mysis), pós-larva, juvenil e finalmente adulto, com cada estágio possuindo sua microbiota característica. A diversidade de bactérias no intestino atinge estabilidade no estágio pós-larval, porém o animal continua mais suscetível a doenças até a fase juvenil do que quando adulto. Isso ocorre pois a colonização do intestino ocorre em estágios muito iniciais do ciclo de vida do animal (Hembrom *et al.*, 2024). Em *P. vannamei*, esse processo se inicia na fase de náuplio 5 e se estende ao longo de diferentes estágios da vida. Nesse estágio, o orifício anal realiza movimentos de “bebida anal” antes mesmo do orifício da boca se abrir e a colonização propriamente dita se iniciar. De forma geral, o desenvolvimento da microbiota em animais aquáticos ocorre pelo contato com o ambiente ao redor e é influenciado pela alimentação, secreção de hormônios e absorção de nutrientes. Nesses animais, a microbiota do trato digestório atua na produção de enzimas digestivas, inibição do crescimento de patógenos por competição, e fornecimento de elementos essenciais para o metabolismo do hospedeiro (Tzuc *et al.*, 2014).

Mais de 100 isolados já foram obtidos do trato intestinal do camarão branco, pertencendo principalmente aos gêneros *Photobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus* e à família Enterobacteriaceae. Considerando que 99% das bactérias de ambientes marinhos não são cultiváveis, esses resultados não são representativos da diversidade e abundância da microbiota de *P. vannamei*. Por isso, o melhor método para estudar a composição dessa microbiota é o sequenciamento do gene 16S rRNA. Assim como na maioria dos animais aquáticos, Proteobacteria é o filo mais abundante e estável no trato intestinal do camarão branco. Em seguida, aparecem os filos Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria, porém suas abundâncias relativas variam bastante dependendo do ambiente, do estágio de vida e da dieta do animal. Actinobacteria, por exemplo, é dominante em camarões brancos cultivados em águas com baixa salinidade. Como actinobactérias costumam ser detectadas no trato intestinal de peixes de água doce, teoriza-se que essa pode ser uma das adaptações adotadas por *P. vannamei* para sobreviver nessas condições. A nível de família, Rhodobacteriaceae e Flavobacteriaceae são dominantes em todos os estágios de crescimento (Li *et al.*, 2018).

O trato gastrointestinal (GIT) dos camarões é dividido em três partes: anterior (estômago), medial (hepatopâncreas) e posterior (intestino, que também é dividido em

porções anterior e posterior). Como cada uma dessas porções possuem características diferentes, como níveis de oxigênio, disponibilidade de nutrientes e características físico-químicas, é natural que suas microbiotas variem bastante entre si quanto a composição, diversidade e abundância relativa. Apesar disso, compartilham alguns grupos microbianos, como Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, *Streptococcus* e *Oceaniovalibus*, filos e gêneros mais abundantes em todas as porções do GIT. As funções principais do hepatopâncreas são a produção de enzimas digestivas, metabolismo de nutrientes e regulação da imunidade inata do hospedeiro. O estômago é a porção menos estudada do GIT do camarão, mas mesmo possuindo a menor diversidade bacteriana, também está envolvido na digestão e processamento de nutrientes. Além dos gêneros já mencionados, *Vibrio*, *Sphingomonas*, *Salinarimonas* e *Oceaniovalibus* também se destacam. Já o intestino, porção mais estudada devido aos impactos de seu microbioma no metabolismo e fisiologia do hospedeiro, apresenta pouca diferença quanto à comunidade microbiana em sua porção anterior e posterior, e também a maior diversidade microbiana dentre as porções do GIT (principalmente o intestino anterior), com prevalência dos gêneros *Actibacter*, *Ilumatobacter* e *Litorilinea*. Quanto à comunidade de actinobactérias, sua abundância relativa é de até 20% nas diferentes partes do GIT, sendo bem mais presente no intestino posterior e anterior. Os gêneros *Ilumatobacter* e *Corynebacterium* são representativos em todas as porções do GIT do camarão, que apresenta também *Nocardioides* no intestino posterior e no hepatopâncreas (Chaudhary *et al.*, 2024).

Crustáceos, como o camarão branco, não possuem um sistema imunológico adaptativo, tendo que contar com seu sistema imune inato para se defender de patógenos e microrganismos indesejados por um trabalho conjunto dos sistemas celular e humoral. Felizmente, as interações ecológicas no microbioma e entre o microbioma e o hospedeiro ajudam a dar robustez a essa resposta imune, daí a importância de entender melhor essas interações. Na aquicultura de *P. vannamei*, o uso de antibióticos é restrito devido às legislações quanto à qualidade dos alimentos, o que torna o combate a doenças infecciosas mais difícil. Apesar disso, o uso excessivo de antibióticos nos tanques e nas dietas leva ao desenvolvimento de RAM e acúmulo de antibióticos no tecido animal (Zhou *et al.*, 2024; Hembrom *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2018).

Diante do apresentado, é evidente o papel das actinobactérias na imunidade de diversos animais, como o camarão. Por serem importantes produtores de metabólitos com atividade antimicrobiana, essas bactérias conseguem atuar na inibição de patógenos e proteção do hospedeiro. Quando submetidas ao estresse químico dos antibióticos, elas

precisam se adaptar para conseguir inibir os patógenos, que adquirem resistência. Por isso, de um ponto de vista biotecnológico, actinobactérias ainda são uma fonte promissora de antibióticos que podem atuar na esfera clínica e salvar milhões de vidas. Apesar de ser um conhecido *hotspot* de actinobactérias, ainda não há estudos abordando o cultivo *in vitro* e potencial biotecnológico de actinobactérias presentes no intestino de camarões. Utilizando meios de cultura e antibióticos específicos, é possível se isolar actinobactérias de teoricamente qualquer habitat, e esse é o primeiro trabalho que propõe com sucesso o isolamento e aplicação biotecnológica das actinobactérias simbióticas de *P. vannamei* e de camarões em geral. Ao se utilizar essas abordagens, é possível se descobrir novas espécies e biomoléculas de potencial biotecnológico inestimável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos todos os procedimentos experimentais executados ao longo da pesquisa. Todos os meios de culturas utilizados nas etapas de isolamento, caracterização e manutenção da coleção foram suplementados com cicloheximida (50µg/mL, para inibição do crescimento de fungos) e ácido nalidíxico (20µg/mL, para inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas) esterilizados por membrana MilliPore 0,22 µm e adicionados aos meios na hora de verter (Balagurunathan *et al.*, 2020). Para as coinoculações dos testes de atividade antimicrobiana, foi utilizada apenas a cicloheximida.

4.1 Obtenção dos camarões

Camarões adultos (>90 dias de cultivo) frescos e saudáveis foram coletados de viveiros de cultivo superintensivo (*raceway*) com salinidade em torno de 3‰ do Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC – LABOMAR/UFC). Os animais foram cultivados sem adição de probióticos, prebióticos ou antibióticos. Após coleta, os camarões foram transportados vivos na água do cultivo até o laboratório, onde foram tratados no mesmo dia (projeto SisGen nº ADF53F9). Cada camarão foi pesado individualmente, para no final se tirar a média do tamanho dos animais usados no trabalho.

4.2 Isolamento das actinobactérias

O isolamento de actinobactérias do trato intestinal de camarão ocorreu seguindo o protocolo de Li *et al.* (2020) com adaptações. Os animais foram dessensibilizados em água com gelo, e após isso os intestinos inteiros foram removidos assepticamente, pesados em conjunto e homogeneizados em solução salina estéril (1:9 w/v) com um bastão de vidro estéril. O homogenato foi diluído serialmente de 10^{-1} a 10^{-6} e 100µL de cada diluição foram inoculados em triplicata por *spread plate* nos meios de cultura: Peptone Yeast Extract - Malt Extract Agar (GLM agar) (Das *et al.*, 2018), Starch Casein Agar (SCA) e Küster's Agar (KA) (Mohseni *et al.*, 2013). As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 21 dias. A cada 7 dias, as colônias obtidas no *spread plate* foram purificadas por esgotamento em estrias em meio de cultura International *Streptomyces* Project 2 (ISP2) (Mohseni *et al.*, 2013). Os isolados com característica morfológica de actinobactérias foram selecionados e depositados em coleção com o código SGA (Shrimp Gut Actinobacteria).

4.3 Armazenamento da coleção

Para uso a curto prazo, foi feita uma coleção em caldo ISP2 e repiques em ágar ISP2, e para armazenamento a médio prazo em tubos com ágar ISP2 inclinado com óleo mineral. Para armazenamento a longo prazo, os isolados de actinobactérias foram armazenados como suspensão de esporos seguindo o protocolo de Shepherd *et al.* (2010) com modificações. As colônias foram inoculadas com um *swab* estéril em toda a superfície de uma placa contendo meio ISP2 e incubadas em estufa bacteriológica a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Após crescimento, foi adicionado 3 mL de água destilada e uma gota de TWEEN 80 estéreis à placa, e os esporos foram raspados com cuidado usando uma alça de Drigalski estéril. A água contendo os esporos foi então transferida em alíquotas iguais para 2 microtubos, onde foi agitada vigorosamente em agitador tipo vórtex para quebrar as cadeias de esporos. Os microtubos contendo os esporos foram centrifugados a $2000 \times g$ por 10 min a 4°C , o sobrenadante descartado, e os esporos ressuspensos em meio ISP2 com glicerol estéril 25% e transferidos para tubos criogênicos rosqueados, onde foram mantidos armazenados a -20°C .

4.4 Caracterização cultural dos isolados

A caracterização cultural foi realizada segundo o protocolo de Wink (2012) com modificações. Em uma placa com 12 poços, foram adicionados os meios ISP1, ISP2, SCA e MHA (2 mL por poço) (Balagurunathan *et al.*, 2020). Em seguida, os isolados de SGA foram inoculados por *spot* com uma agulha de inoculação no centro de cada poço. As placas foram fechadas e incubadas em estufa bacteriológica a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Ao fim desse período, as cores das colônias foram classificadas de acordo com a tabela de cores RAL em cada meio de cultura. Os testes foram realizados em triplicata, em dois ensaios independentes.

4.5 Caracterização micromorfológica dos isolados

Após o crescimento das culturas puras em ágar ISP2, foi realizada uma coloração de Gram, para observação da morfologia e análise de pureza, e caracterização micromorfológica (microcultivo) segundo Santos *et al.*, (2019). Lâminas de vidro estéreis foram acomodadas em placas de Petri estéreis. *Pellets* de meio Bennett (Gordon; Smith, 1955) de 1 cm de diâmetro foram transferidos assepticamente com o auxílio de uma pinça flambada para sobre as lâminas. Os isolados de actinobactérias foram inoculados ao redor do *pellet*, e então uma lamínula

estéril foi posta sobre o *pellet*, para que as hifas cresçam e deixem uma impressão digital sobre as lamínulas. A fim de manter a umidade dentro da placa (uma vez que há apenas um volume muito reduzido de meio de cultura), foram adicionados dois tufo de algodão úmido estéreis. As placas foram fechadas e incubadas em incubadora tipo BOD a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Ao fim desse período, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas, adicionadas a uma nova lâmina estéril com uma gota do corante azul de Amann e seladas com esmalte transparente. As lâminas foram observadas por microscopia de luz em lente de imersão (1000x de aumento) e a micromorfologia das hifas classificada em *rectus*, *flexibilis*, *retinaculum-apertum* e *spira* (Abdelrahman *et al.*, 2022). Os testes foram realizados em triplicata, em dois ensaios independentes.

4.6 Cepas para atividade antimicrobiana

A fim de evitar trabalhar com espécies repetidas da mesma actinobactéria, a caracterização cultural foi utilizada como método de seleção. Utilizando os dados de cor de micélio aéreo e reverso em cada meio de cultura e micromorfologia, foi feito um dendrograma de similaridade a partir da distância euclidiana no software RStudio (versão 2024.12.1-563, R versão 4.4.2) com os dados normalizados para que os dados de cor de micélio (códigos da tabela RAL) e micromorfologia (*rectus* = 1; *flexibilis* = 2; *retinaculum-apertum* = 3; cocoide, sem formação de filamentos = 4; bacilar, sem formação de filamentos = 5) fiquem na mesma escala. Caso mais de um isolado apresentasse as mesmas micromorfologia e características culturais em todos os meios, um deles seria escolhido por sorteio para os testes seguintes e os demais seriam excluídos, ficando apenas armazenados em coleção.

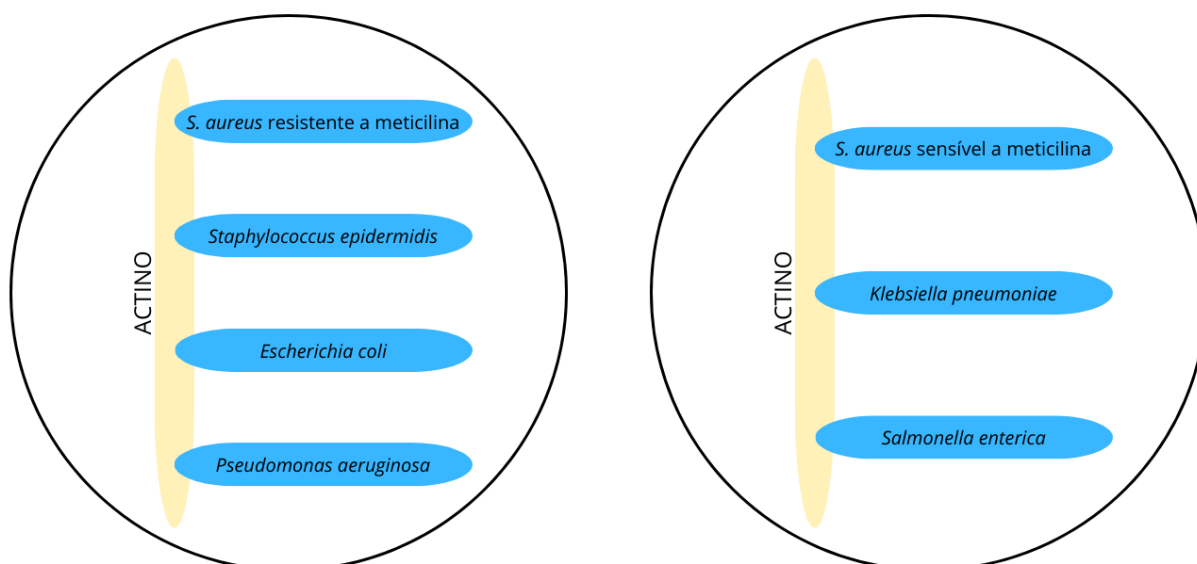
As cepas indicadoras utilizadas no trabalho foram *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 (MRSA, resistente a meticilina e com resistência intermediária heterogênea a vancomicina), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA25), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 (KP), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 (PA), *Salmonella enterica* ATCC 14028 (SE), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (SEp, resistente a meticilina) e *Escherichia coli* ATCC 11303 (EC).

Com exceção de SEp e EC, que são NB1, todas as cepas mencionadas possuem nível de biossegurança 2 (NB2), por isso, todos os ensaios que as utilizaram foram realizados no Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), da Universidade Federal do Ceará (UFC), que possui os equipamentos e expertise necessários para trabalhar com esses microrganismos.

4.7 Screening de atividade antimicrobiana

O método de *cross-streak* foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana das actinobactérias contra as cepas indicadoras utilizando o método de Nofiani *et al.* (2021) com modificações, conforme esquematizado na Figura 1. Os isolados de actinobactéria foram inoculados em linha reta com *swab* em uma placa com ágar Mueller Hinton e incubados a 28°C por 6 dias. No dia anterior ao teste, as cepas indicadoras foram inoculadas em meio Mueller Hinton líquido e incubadas *overnight* em estufa bacteriológica a 37°C. Após esse período, foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com a mesma quantidade de meio Mueller Hinton novo. Enfim, essas cepas foram ajustadas para uma densidade de 10^8 UFC/mL via OD₆₂₀ e inoculadas com *swab* perpendicularmente às actinobactérias, sendo então incubadas a 37°C por 18h em estufa bacteriológica. A presença de halo entre a actinobactéria e a cepa indicadora significa resultado positivo, e a ausência de halo, resultado negativo. Os testes foram realizados em triplicata, em dois ensaios independentes.

Figura 1 – Esquematização da inoculação de microrganismos para avaliação da atividade antimicrobiana de actinobactérias pelo método do *cross-streak*.



Fonte: elaborado pelo autor.

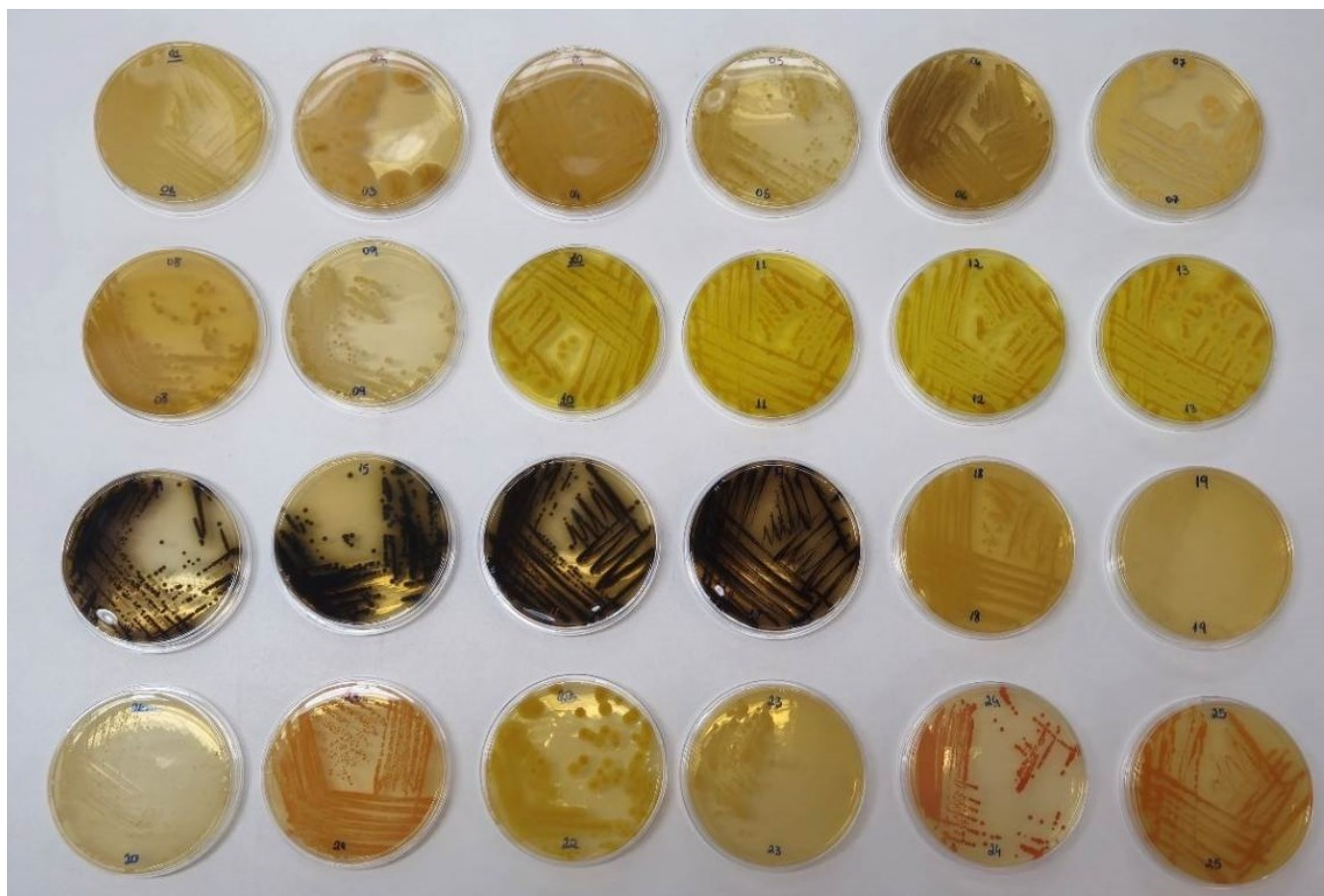
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio desta pesquisa são apresentados e discutidos nesta seção, ressaltando o potencial antimicrobiano e diversidade das actinobactérias isoladas.

5.1 Criação da coleção

Para realização do trabalho, foram obtidos 25 camarões com $27,3 \pm 3,96$ g, o que totalizou 970 mg de intestinos. Após os 21 dias de incubação e 3 rodadas de isolamento, foram obtidos um total de 109 isolados. Destes, 28 não cresceram quando transferidos para o meio ISP2, resultando em 81 isolados. Ao se retirar os isolados sem características de actinobactérias, obtivemos 25 isolados, que foram identificados de 01 a 25 e depositados na coleção Shrimp Gut Actinobacteria (SGA-01 a SGA-25; SGA-02 posteriormente foi retirada da coleção por ausência de crescimento), apresentada na figura 2.

Figura 2 – Coleção “Shrimp Gut Actinobacteria” em meio ISP2.



Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar da microbiota de invertebrados aquáticos ainda não ser tão estudada, a microbiota de camarões se destaca na literatura sobre as demais (Holt *et al.*, 2021). Dentre os tópicos abordados, se encontra a resposta da microbiota a períodos de fome (Dai *et al.*, 2018), a sucessão ecológica espaço-temporal das comunidades microbianas no intestino (Xiong *et al.*, 2019), até a influência de microplásticos na composição da microbiota (Li *et al.*, 2021a). Contudo, o isolamento e aplicação biotecnológica dessas bactérias, em especial actinobactérias, ainda é um tópico relativamente intocado.

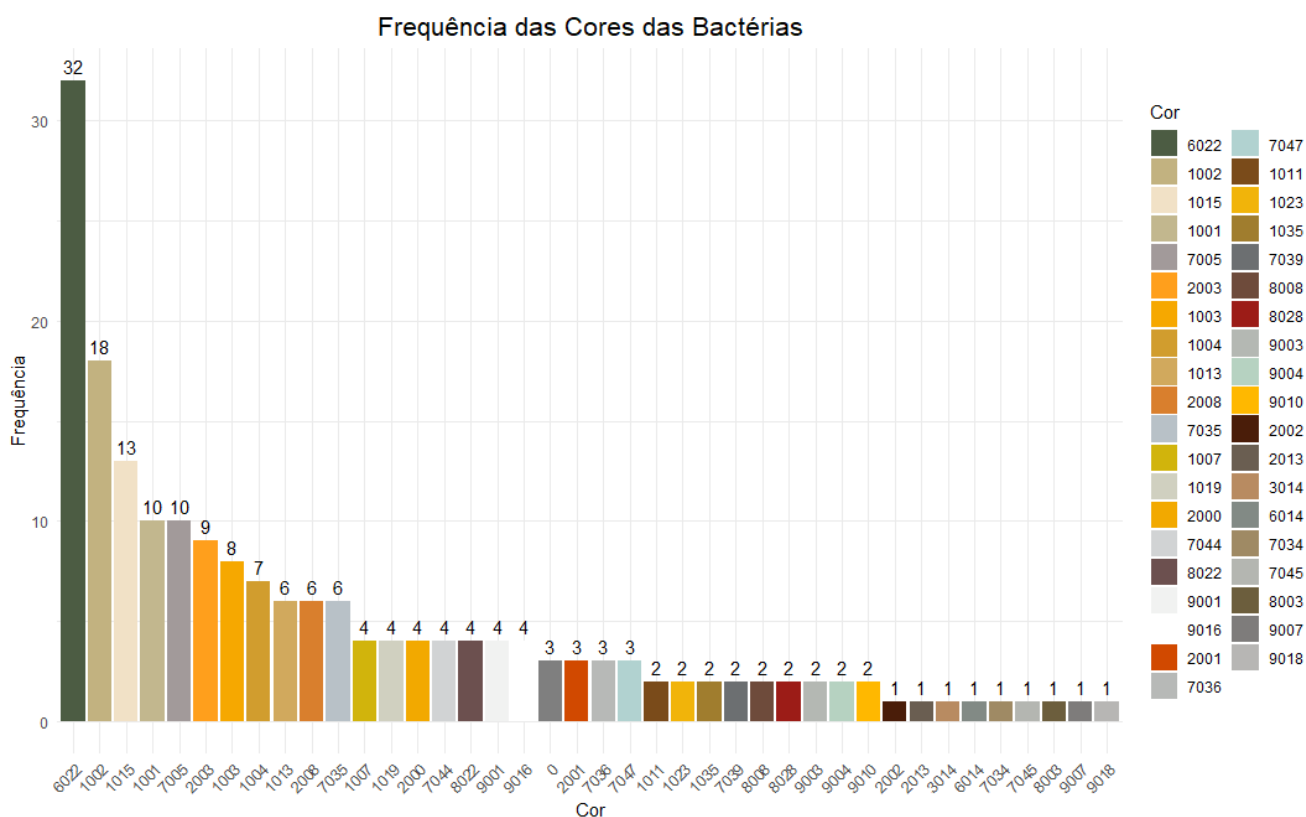
Actinobactérias simbióticas, por outro lado, são um tema bastante estudado. Contudo, as tentativas de isolar essas bactérias não são tão frequentes quanto estudos moleculares. No que diz respeito a trato digestório, já se isolou com sucesso actinobactérias de besouro-capricórnio mediterrâneo (*Cerambyx welensii*, por Santamaría *et al.*, 2020), cavala indiana (*Rastrelliger kanagurta*) e *Panna microdon*, ambos por Vignesh *et al.*, (2019) e minhocas (*Perionyx excavatus*, por Samanta e Das, 2015), apenas para citar alguns exemplos. Quanto a crustáceos, os estudos são ainda mais raros, com apenas o trabalho de Protasov *et al.*, (2020) que isolou actinobactérias de sete espécies de anfípodes e avaliou sua atividade antimicrobiana e capacidade de expressar genes biossintéticos. Esse trabalho, contudo, não visou o isolamento a partir do trato intestinal, provavelmente devido ao tamanho muito reduzido desses animais.

Este trabalho é o primeiro a propor e ter êxito em isolar actinobactérias da microbiota de camarões. Em outras palavras, é o primeiro trabalho a acessar a actinobiota de camarões. A coleção inédita obtida está armazenada no Laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Ceará, e seu potencial biotecnológico está disponível e aguardando para ser mais estudado em pesquisas futuras.

5.2 Caracterização cultural dos isolados

Os isolados tiveram a cor de seu micélio aéreo e reverso determinadas nos meios ISP1, ISP2, SCA e MHA de acordo com a tabela RAL e apresentaram cores entre verde oliva (RAL 6022), sendo a mais comum com 32 ocorrências, amarelo areia (RAL 1002) com 18 ocorrências, até Vermilion (RAL 2002), laranja pérola (RAL 2013), Telegray 1 (RAL 7045) e cinza alumínio (RAL 9007), dentre outros com apenas uma ocorrência. A frequência das cores está detalhada na Figura 3, e discriminada por isolado e meio de cultura na Tabela 1.

Figura 3 – Distribuição de frequências das cores de micélio aéreo e reverso das actinobactérias isoladas do intestino de camarão (SGA).



Fonte: elaborado pelo autor.

Pigmentos são essenciais na caracterização de actinobactérias. Biotecnologicamente, podem ser aplicados na indústria têxtil, cosmética, de tingimentos, de alimentos e farmacêutica, podendo apresentar propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anticoagulantes, antitumor etc. (Chakraborty *et al.*, 2015). Actinobactérias podem produzir pigmentos de diversas cores e tons, variando entre amarelo, violeta, cinza, rosa, laranja, verde, azul, marrom e vermelho (Fernandes *et al.*, 2021; Urtgam *et al.*, 2023). Nesse trabalho, foram encontradas actinobactérias com pigmentos nos grupos amarelo (RAL 1000), laranja (RAL 2000), vermelho (RAL 3000), verde (RAL 6000), cinza (RAL 7000), marrom (RAL 8000) e branco (RAL 9000), o que condiz com as possíveis cores mencionadas na literatura.

Tabela 1 – Características culturais e morfológicas das actinobactérias isoladas do intestino de camarão (SGA).

Isolado	Meios de cultura								Morfologia das cadeias de esporos
	ISP1		ISP2		SCA		MHA		
	Aéreo	Reverso	Aéreo	Reverso	Aéreo	Reverso	Aéreo	Reverso	
SGA-01	7036	8008	1001	1004	9003	3014	1015	1001	Rectus
SGA-03	8028	1002	9001	1002	9004	7039	7035	1002	Flexibilis
SGA-04	8028	1002	9001	1002	9004	7039	7035	1002	Flexibilis
SGA-05	1001	7045	9003	1001	1015	1015	1015	1001	Flexibilis
SGA-06	7036	6014	7045	8008	7047	1002	1002	1001	Flexibilis
SGA-07	1013	1015	9010	1002	7005	7005	9010	1015	Rectus
SGA-08	1035	1011	7047	1002	7035	7044	1001	1002	Retinaculum-apertum
SGA-09	1035	1011	7047	1002	7035	7044	1001	1002	Retinaculum-apertum
SGA-10	1019	8022	9016	1007	7005	7005	1013	1004	Flexibilis
SGA-11	1019	8022	9016	1007	7005	7005	1013	1004	Flexibilis
SGA-12	1019	8022	9016	1007	7005	7005	1013	1004	Flexibilis
SGA-13	1019	8022	9016	1007	7005	7005	1013	1004	Flexibilis
SGA-14	6022	6022	6022	6022	6022	6022	6022	6022	Flexibilis
SGA-15	6022	6022	6022	6022	6022	6022	6022	6022	Flexibilis
SGA-16	6022	6022	6022	6022	6022	6022	6022	6022	Flexibilis
SGA-17	6022	6022	6022	6022	6022	6022	6022	6022	Flexibilis
SGA-18	7036	8003	9018	1004	9007	7034	7035	1002	Retinaculum-apertum
SGA-19	1013	1001	9001	1004	7035	9001	1015	1002	Flexibilis
SGA-20	7044	7044	1015	1001	S/cresc.	S/cresc.	1015	1015	Cocoide, sem formação de filamentos
SGA-21	2001	2001	2000	2000	2000	2000	2013	2003	Flexibilis
SGA-22	1003	1003	1023	1023	1003	1002	1003	1003	Retinaculum-apertum
SGA-23	1003	1015	1002	1002	1003	1015	1003	1015	Cocoide, sem formação de filamentos
SGA-24	2008	2008	2002	2001	2008	2008	2008	2008	Bacilar, sem formação de filamentos
SGA-25	2003	2003	2003	2003	2003	2003	2003	2003	Bacilar, sem formação de filamentos

Fonte: elaborado pelo autor.

Muitas vezes, como no caso das SGA 01, 03, 05, 08 e 10, isolados crescendo em diferentes meios de cultura apresentam diferentes cores de micélios aéreo e reverso, uma vez que as diferentes fontes de carbono, nitrogênio e demais nutrientes geram respostas biológicas e metabólicas diferentes (Ratte *et al.*, 2022). Os meios utilizados na caracterização cultural foram ISP1 (triptona e extrato de levedura), ISP2 (extrato de levedura, extrato de malte e dextrose), SCA (amido, caseína e diferentes micronutrientes como sulfato de magnésio e carbonato de cálcio) e Mueller Hinton (extrato de carne, caseína hidrolisada e amido) (Kurnianto *et al.*, 2020). Por terem formulações bastante variadas, é natural a observação dessa diversidade morfológica, uma vez que a ativação de diferentes rotas metabólicas para absorção de diferentes nutrientes pode acabar levando também à produção de pigmentos diversos.

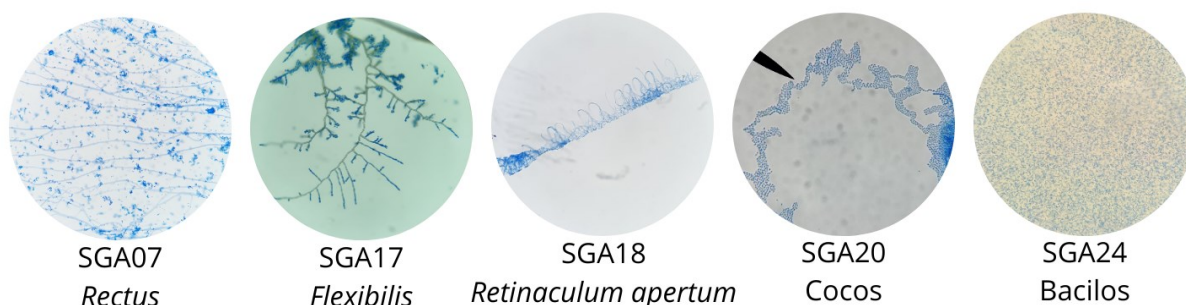
Além das condições nutricionais, as condições de cultura e idade do isolado também influenciam na produção de pigmentos (Fitri *et al.*, 2021). Como todos os isolados utilizados no trabalho eram novos e foram cultivados nas mesmas condições, pode-se afirmar que essas variáveis não influenciaram a diversidade observada. Contudo, diferentes condições de cultura podem ser ponto de partida para se explorar a produção de novos pigmentos por esses isolados, assim como a prospecção de diferentes atividades biológicas desses pigmentos.

A solubilidade do pigmento é o que dita as variações que ele causa nas cores do meio e do micélio. Pigmentos hidrossolúveis se diluem no meio de cultura, o colorindo, enquanto pigmentos hidrofóbicos, ou lipossolúveis, colore as colônias em si. Esse fenômeno é crucial na identificação de novas espécies (Selvaraj *et al.*, 2023). Toda a coleção SGA produz pigmentos lipossolúveis, apresentando colônias de diversas cores em vários meios de cultura.

5.3 Caracterização micromorfológica dos isolados

A técnica de microcultivo foi utilizada para se observar as estruturas das cadeias de esporos da coleção. 58,3% da coleção (14 isolados) apresentaram cadeias de esporos do tipo *flexibilis*, 8,3% (2 isolados) do tipo *rectus*, 16,6% (4 isolados) do tipo *retinaculum-apertum* e 16,6% não apresentaram filamentos, sendo 2 com morfologia cocoide e 2 com morfologia bacilar, conforme Figura 4. A morfologia de cada isolado está discriminada na Tabela 1.

Figura 4 – Morfologias das cadeias de esporos das actinobactérias isoladas do intestino de camarão (SGA), observadas via microcultivo com aumento de 1000x.



Fonte: elaborado pelo autor.

O arranjo das cadeias de esporos é um critério fundamental para a identificação taxonômica de actinobactérias (Fatima *et al.*, 2019). As morfologias mais clássicas de actinobactérias cultiváveis são micélios permanentes e altamente diferenciados e ramificados (*Streptomyces* e *Frankia*), mas também se pode observar hifas fragmentadas (*Nocardia*), filamentos alongados que não chegam a formar micélio verdadeiro (*Rhodococcus*), etc. Alguns gêneros não produzem micélio (*Corynebacterium*), enquanto outros se apresentam em forma de cocos (*Micrococcus*) ou cocobacilos (*Arthrobacter*) (Barka *et al.*, 2016).

Apesar da comparação das estruturas observadas via microcultivo com padrões da literatura ser aceito como uma forma preliminar de identificação de actinobactérias a nível de gênero (Santos *et al.*, 2019), neste trabalho se optou por usar essa metodologia apenas para caracterizar as cadeias de esporos. Apesar disso, a morfologia espiralada/ondulada clássica de *Streptomyces (spira)* (Brito *et al.*, 2015) não foi observada em nenhum dos isolados. Isso se mostra um resultado inesperado, dada a grande frequência de isolamento desse gênero nos mais diversos habitats. Contudo, vale ressaltar que apesar de ser o gênero mais isolado, ele não é o mais abundante, por isso pode-se inferir que os métodos de isolamento e meios de cultura empregados podem ter favorecido gêneros mais raros ou inéditos (Parra *et al.*, 2023).

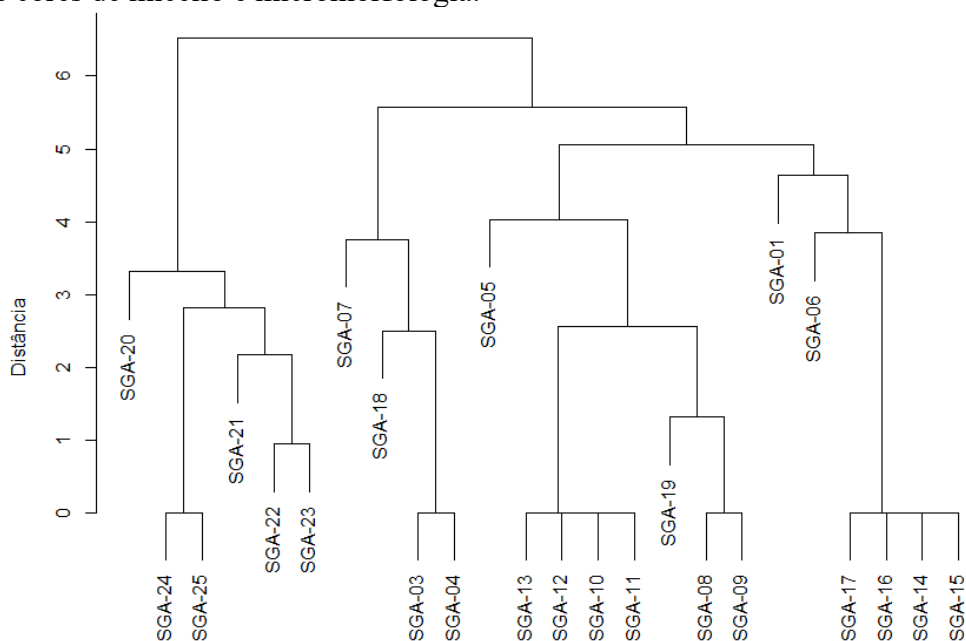
Assim como Dornelas *et al.*, (2017), que trabalharam com uma coleção de actinobactérias isoladas de solos tropicais, neste trabalho a morfologia dominante foi a de hifas flexíveis, seguidas de *retinaculum-apertum*. De forma similar a Uesugi *et al.* (2024), que isolaram actinobactérias de solos de compostagem de palmeira-de-dendê, nenhum isolado apresentou morfologia espiralada, enquanto Delbari *et al.*, (2023) observaram essa morfologia como mais frequente em actinobactérias endofíticas. Isso apenas comprova a diversidade

morfológica desse filo, destacando como a abundância de diferentes fenótipos varia radicalmente de acordo com a fonte de isolamento.

5.4 Escolha dos isolados para os testes de atividade antimicrobiana

Segundo Fitri *et al.*, (2021), a diversidade de características morfológicas pode ser utilizada para agrupar diferentes isolados de actinobactérias. Com isso em mente, esses critérios foram utilizados para filtrar os isolados utilizados nas etapas posteriores do trabalho. Conforme mostrado na Tabela 1, SGA-01, SGA-05, SGA-06, SGA-07, SGA-18, SGA-19, SGA-20, SGA-21, SGA-22, SGA-23, SGA-24 e SGA-25 apresentaram micromorfologia e combinações de cor de micélio únicas nas condições testadas. SGA-03 e SGA-04, por outro lado foram idênticas em todas as condições, assim como SGA-08 e SGA-09; SGA-10, SGA-11, SGA-12 e SGA-13; e SGA-14, SGA-15, SGA-16 e SGA-17. Esses dados podem ser resumidos no dendrograma de similaridade (Figura 5), onde esses isolados aparecem agrupados. Por isso, após o sorteio para eliminar os isolados com características repetidas, o número de isolados trabalhados foi reduzido de 24 para 16: **SGA-01, SGA-03, SGA-05, SGA-06, SGA-07, SGA-09, SGA-11, SGA-17, SGA-18, SGA-19, SGA-20, SGA-21, SGA-22, SGA-23, SGA-24 e SGA-25.**

Figura 5 – Dendrograma de similaridade dos isolados de actinobactérias da coleção SGA quanto às cores de micélio e micromorfologia.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.5 Teste de atividade antimicrobiana

Os 16 isolados de actinobactérias escolhidos foram testados contra 7 cepas indicadoras pelo método do *cross-streak*. Nesse método, as bactérias são cultivadas na mesma placa, a fim de se observar a presença ou não de halo de inibição. Dos 16 isolados testados, o destaque vai para a SGA-18, que inibiu as 7 bactérias indicadoras, e SGA-05, que inibiu todas menos *K. pneumoniae* e *S. enterica*. SGA-06 e SGA-19 inibiram duas bactérias cada, enquanto SGA-03 inibiu apenas *P. aeruginosa*. Todas as outras SGA apresentaram resultado negativo contra todas as cepas indicadoras testadas, conforme representado na Figura 6.

Figura 6 – Cepas inibidas pelas actinobactérias do intestino do camarão pelo método do *cross streak*.

Isolado	MRSA	SEp	KP	SE	PA	EC	SA25
SGA-01							
SGA-03							
SGA-05							
SGA-06							
SGA-07							
SGA-09							
SGA-11							
SGA-17							
SGA-18							
SGA-19							
SGA-20							
SGA-21							
SGA-22							
SGA-23							
SGA-24							
SGA-25							

Células vermelhas indicam ausência de inibição, enquanto células azuis indicam inibição. MRSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 700698; SEp: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984; KP: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031; SE: *Salmonella enterica* ATCC 14028; PA: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619; EC: *Escherichia coli* ATCC 11303; SA25: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

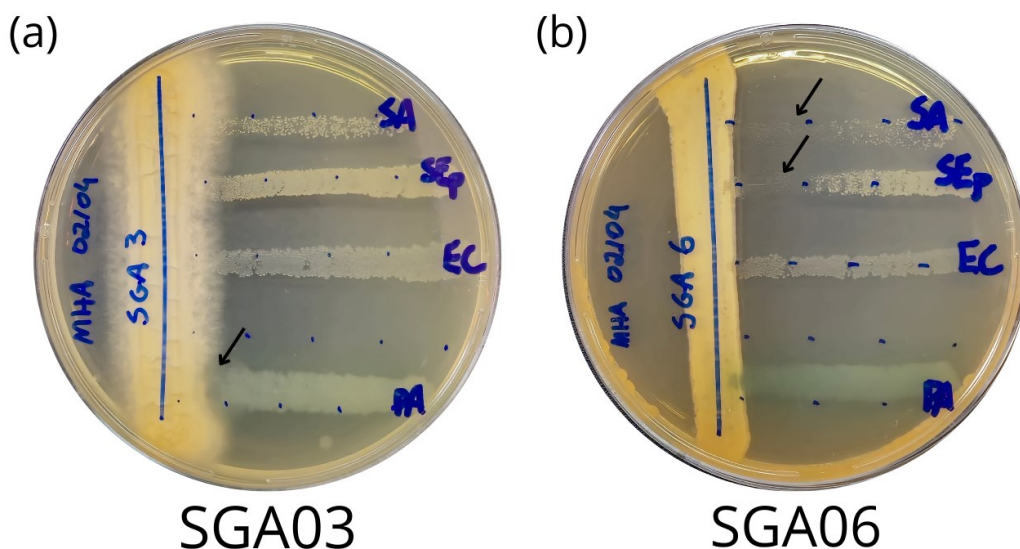
Fonte: elaborado pelo autor.

Nenhum dos isolados que apresentaram inibição (SGA-03, SGA-05, SGA-06, SGA-18 e SGA-19) estava dentre as cepas que passaram por sorteio, ou seja, todos possuem características únicas quando comparadas às demais SGA. Isso vai ao encontro da máxima de que actinobactérias raras possuem grande potencial antimicrobiano e podem inibir patógenos multirresistentes (Amin *et al.*, 2020).

A primeira substância bioativa relatada para actinobactérias data de 1924, antes mesmo da penicilina de Fleming (1929), mas só foi purificada e nomeada de actinomicina por Selman Waksman e seus alunos em 1937 (Waksman; Woodruff, 1940). Os pesquisadores acreditavam que esse antibiótico era um dos mais potentes já descobertos, mas ele logo também se mostrou um dos mais tóxicos. Em 1944, o aluno de PhD. de Waksman, Albert Schatz, descobriu a estreptomicina a partir de uma mudança sugerida pelo professor no protocolo de obtenção da actinomicina. Sob orientação dos advogados da empresa farmacêutica Merck, o prof. Waksman conseguiu patentear esse processo. Alguns anos depois, em 1952, o pesquisador ganhou o Nobel de Fisiologia ou Medicina pela descoberta da estreptomicina, primeiro antibiótico capaz de tratar a tuberculose bacteriana (Woodruff, 2014).

SGA-03 inibiu apenas a Gram-negativa *P. aeruginosa* e SGA-06 inibiu apenas as Gram-positivas *S. aureus* (Figura 7). Os demais isolados apresentaram inibição mista tanto de Gram-positivas quanto negativas. Esse fenômeno está de acordo com estudos anteriores, que mostram que actinobactérias apresentam atividade tanto contra Gram-positivas quanto Gram-negativas (Ibnouf *et al.*, 2022; Al-Ansari *et al.*, 2019). Dadas as diferenças morfológicas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em especial a membrana externa de Gram-negativas, é natural que essas bactérias apresentem sensibilidades variadas frente a produtos naturais diferentes (Ilic *et al.*, 2007). Alguns extratos brutos de actinobactérias apresentam até mesmo mais atividade do que drogas já comercializadas e consolidadas, como tetraciclina (Gebreyohannes *et al.*, 2013).

Figura 7 – Teste de atividade antimicrobiana das actinobactérias SGA03 (a) e SGA06 (b).

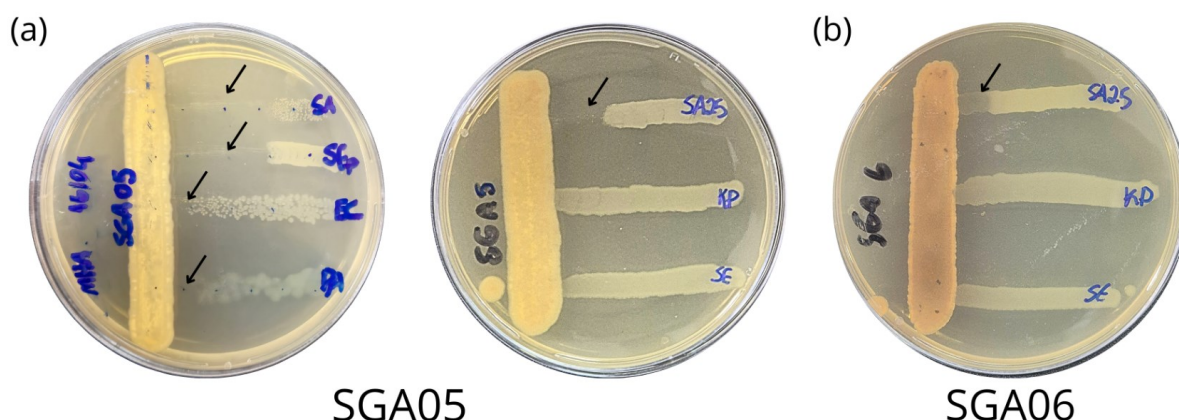


SA: *S. aureus* resistente a meticilina; SEP: *S. epidermidis*; EC: *E. coli*; PA: *P. aeruginosa*. Os halos de inibição estão indicados com setas pretas. Fonte: elaborado pelo autor.

Pseudomonas aeruginosa foi o patógeno mais sensível às actinobactérias neste trabalho. Das 5 actinobactérias que apresentaram resultado positivo para inibição de alguma cepa, 4 a inibiram. Esse resultado é intrigante, visto que essa bactéria é de grande preocupação clínica e apresenta resistência intrínseca a diversos antibióticos devido a sua baixa permeabilidade celular, capacidade de formar biofilme, presença de bombas de efluxo e de enzimas modificadoras de antibióticos. Além disso, *P. aeruginosa* possui uma versatilidade metabólica que resulta em infecções de alta morbidade e taxa de mortalidade principalmente para pacientes imunocomprometidos ou com doenças crônicas (Krell; Matilla, 2022).

Staphylococcus aureus (resistente e sensível a meticilina) e *Staphylococcus epidermidis* foram as segundas mais inibidas, com 3 isolados de actinobactéria inibindo cada. As duas cepas de *S. aureus* foram inibidas pelas mesmas actinobactérias: SGA-05, SGA-06 (Figuras 7 e 8) e SGA-18 (Figura 9). As infecções por *S. aureus* são especialmente problemáticas devido à frequência de resistência a antibióticos, principalmente a meticilina (MRSA). As infecções por MRSA costumam ter maior mortalidade, morbidade e tempo de internação quando comparadas às infecções por MSSA (*S. aureus* sensível a meticilina). Contudo, a importância das cepas de MSSA tem crescido, pois apesar de não serem tão monitoradas quanto MRSA, também podem apresentar alta virulência e fatalidade. A resistência a beta-lactâmicos sensíveis a beta-lactamases é virtualmente onipresente em *S. aureus*, e essa bactéria costuma apresentar resistência a quase todos os antibióticos disponíveis, geralmente em combinação (Cheung; Bae, Otto, 2021).

Figura 8 – Teste de atividade antimicrobiana das actinobactérias SGA05 (a) e SGA06 (b).



SA: *S. aureus* resistente a meticilina; SEp: *S. epidermidis*; EC: *E. coli*; PA: *P. aeruginosa*; SA25: *S. aureus* sensível a meticilina; KP: *K. pneumoniae*; SE: *S. enterica*. O teste de inibição da SGA06 contra SA, SEp, EC e PA se encontra na Figura 6. Os halos de inibição estão indicados com setas pretas.

Fonte: elaborado pelo autor.

Vancomicina é a principal droga utilizada para tratar infecções por MRSA, por isso é tão preocupante quando MRSA desenvolve resistência a ela (geralmente pelo espessamento da parede celular). Dessa forma, o aumento na ocorrência de MRSA leva ao aumento no uso de vancomicina e conseqüentemente um aumento na ocorrência de VRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina) (Mondal *et al.*, 2024). O CDC classifica isolados de *S. aureus* em VRSA ou VISA (*S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina) baseado na concentração inibitória mínima (MIC) dos isolados, com $MIC \leq 2 \mu\text{g/mL}$ caracterizando *S. aureus* sensível a vancomicina (VSSA), $MIC \geq 8 \mu\text{g/mL}$ caracterizando VISA e $MIC \geq 16 \mu\text{g/mL}$ caracterizando VRSA (Unni; Siddiqui; Bidaisee, 2021). Existem também *S. aureus* classificadas como hVISA (VISA heterogênea). Colônias desse fenótipo possuem subpopulações de VISA indetectáveis via MIC, sendo assim consideradas precursoras das VISA, uma vez que as VISA podem se tornar dominantes quando submetidas a pressão de seleção como tratamento com vancomicina (Hamasalih *et al.*, 2022).

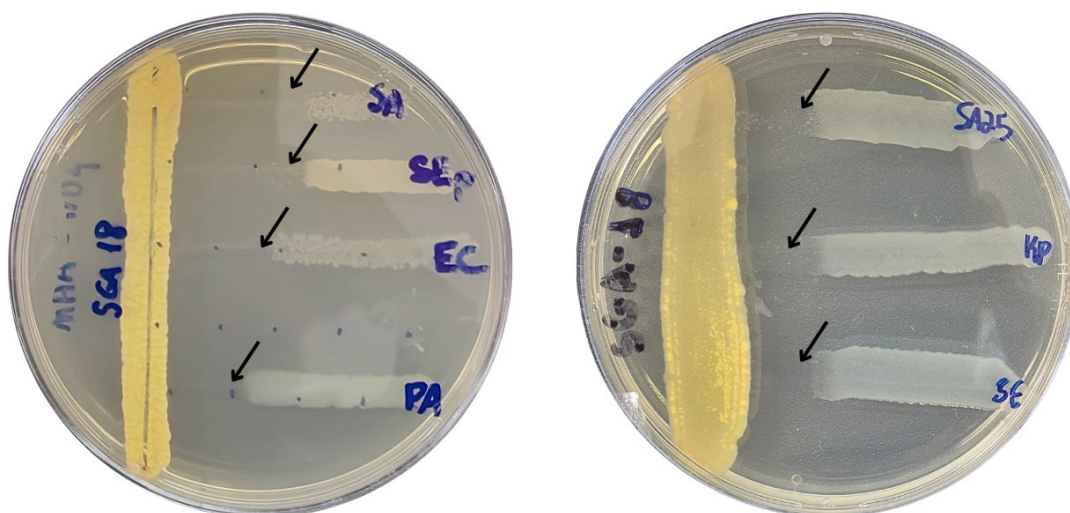
Apesar dessa variedade de resistência a antibióticos específicos, a resistência inespecífica decorrente da formação de biofilme é primordial em *S. aureus*. Segundo o estudo de Trobos e colaboradores (2022), infecções por *S. aureus* não resolvidas estão mais ligadas à forte capacidade de formação de biofilmes, enquanto em *S. epidermidis* a resistência a meticilina e a outros antibióticos é a principal causa de fatalidade, apesar de também formar biofilmes. *S. epidermidis* habita naturalmente a pele do ser humano e é conhecida como um dos principais patógenos oportunistas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A maior parte das infecções por *S. epidermidis* ocorre pelas mesmas cepas que habitam a pele, sendo frequentemente responsáveis por infecções associadas a implantes. *S. epidermidis* possui vários ARGs em elementos genéticos móveis, e também já se encontrou resistência a todas as classes de antibióticos nessa bactéria (Severn; Horswill, 2023). A cepa de MRSA utilizada nesse trabalho (ATCC 700698) também apresenta resistência intermediária heterogênea a vancomicina (hVISA). SGA-05, SGA-06 e SGA-18 inibiram o crescimento de MRSA/hVISA, MSSA e MRSE (*S. epidermidis* resistente a meticilina), o que evidencia o grande potencial desses isolados na prospecção de novas drogas.

Actinobactérias continuam a ser um grupo microbiano de destaque na prospecção de novos produtos naturais devido ao seu aparato enzimático diverso. Os genes envolvidos na biossíntese de antibióticos geralmente se localizam em longos *operons* no cromossomo, que possuem sequências regulatórias capazes de promover ou inibir a expressão gênica sob determinadas condições ambientais (Simeis; Serra, 2021). Por não se saber exatamente quais condições podem ser essas para cada isolado, é provável que muitos genes para síntese de

antibióticos não estejam sendo expressos, e a investigação dessas condições pode configurar uma nova e promissora oportunidade de pesquisa. Em outras palavras, isolados que não apresentaram inibição poderiam vir a apresentar quando confrontados com diferentes condições de cultivo.

Novas oportunidades terapêuticas podem estar escondidas dentre diversos metabólitos de actinobactérias desconhecidas. Historicamente, já se descobriu a produção de eritromicina por *Saccharopolyspora erythraea*, tetraciclina por *Streptomyces aureofaciens*, daptomicina por *Streptomyces roseosporus*, gentamicina por *Micromonospora purpurea*, monensina por *Streptomyces cinnamonensis* e, claro, estreptomicina por *Streptomyces griseus*, para citar alguns exemplos (Alenazi *et al.*, 2023). Isso traz à tona o potencial da SGA-18 (Figura 9), que inibiu todos os patógenos testados e demanda mais estudos a fim de se purificar, identificar e se aprofundar em seu metaboloma.

Figura 9 – Teste de atividade antimicrobiana da actinobactéria SGA18.



SA: *S. aureus* resistente a meticilina; SEp: *S. epidermidis*; EC: *E. coli*; PA: *P. aeruginosa*; SA25: *S. aureus* sensível a meticilina; KP: *K. pneumoniae*; SE: *S. enterica*. Os halos de inibição estão indicados com setas pretas. Fonte: elaborado pelo autor.

O uso de antibióticos na aquicultura é muito comum no mundo todo. Esses compostos geralmente são adicionados às rações ou diretamente aplicados como drogas para prevenir e tratar doenças infecciosas, mas acabam também reduzindo os níveis de gordura e aumentando os níveis de proteína nos animais. Contudo, 80% dos antibióticos aplicados acabam se acumulando no ambiente, gerando os diversos riscos já debatidos acima. Além de sua liberação na água e nos sedimentos como fruto do metabolismo dos animais, os antibióticos também podem se acumular em seus tecidos (Li *et al.*, 2021c; Li *et al.*, 2024). Por isso, é comum se observar resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas da aquicultura, como a

resistência a ampicilina e tetraciclina observada por Rebouças *et al.* (2011) em *Vibrio* spp. isolados de hepatopâncreas e amostras de água do cultivo de *P. vannamei*. Vieira *et al.* (2010) realizaram trabalho semelhante, mas com *E. coli*, cujos isolados mostraram resistência a imipinem, cefalotina e ampicilina. Os resultados obtidos neste trabalho comprovam que, mesmo na ausência de estresses como antibióticos, actinobactérias simbióticas de animais oriundos da aquicultura apresentam o aparato metabólico para expressar atividade antimicrobiana significativa contra microrganismos resistentes, provavelmente para manter a saúde de seu hospedeiro. Investigar o perfil de resistência a antimicrobianos da própria coleção SGA seria um possível passo futuro na direção de conhecer melhor a microbiota do camarão-branco-do-pacífico, especificamente os cultivados.

Como já mencionado, os estudos com isolamento de actinobactérias de crustáceos são muito escassos. No que diz respeito a camarões, não há estudos com isolamento de actinobactérias simbióticas, mas a actinobiota de sedimentos e de águas de tanques de cultivo já foi extensivamente estudada. Phuong e Diep (2020) isolaram 53 actinobactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Nocardioideis* e *Glutamicibacter* da água de tanques de cultivo de camarões, que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *Vibrio parahaemolyticus*. You *et al.* (2005) obtiveram 94 isolados de *Streptomyces* e *Micromonospora* de águas de cultivo de camarão, e esses isolados apresentaram atividade contra as sete espécies de *Vibrio* testadas. Já Gozari *et al.* (2016) usaram os sedimentos de tanques de cultivo de camarão, utilizando pré-tratamentos térmicos, e obtiveram 100 isolados de *Streptomyces* que apresentaram atividade contra *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi* e *V. parahaemolyticus*.

Actinobactérias isoladas do trato intestinal do diplópode *Nedyopus dawydoffiae* inibiram *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumillus*, MRSA e MSSA, com a maioria das actinobactérias inibindo mais de uma cepa. Os pesquisadores utilizaram também diferentes meios de cultura, se deparando com diferentes padrões de inibição, o que condiz com o discutido acima acerca da variação de condições abióticas (Glukhova *et al.*, 2018).

Long *et al.* (2022) isolaram actinobactérias dos ninhos, superfícies corporais e intestino dos cupins *Odontotermes formosanus* e as testaram contra diversos fungos fitopatogênicos, *E. coli*, *S. aureus* e *Micrococcus tetragenus*. Nenhum dos isolados foi capaz de inibir *E. coli*, mas alguns fungos, como *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum graminicola* apresentaram 92% e 86% de inibição respectivamente quando incubados com o extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. BYF106 por 48h.

Já Liu *et al.*, (2024b) isolaram actinobactérias das cornículas e intestino de barata-marrom-fuligem (*Periplaneta fuliginosa*). Dentre os isolados obtidos, a actinobactéria rara *Nocardiopsis* sp. ZLC-87 foi capaz de produzir 7 metabólitos bioativos conhecidos, dentre os quais 4 foram capazes de inibir *M. tetragenus*, *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*. Um desses compostos apresentou também atividade fitotóxica, o que lhe coloca também como potencial herbicida.

Voltando para o ambiente marinho, Setiawan *et al.*, (2021) isolaram actinobactérias simbióticas de diferentes espécies de esponjas e tunicados. Dos quinze isolados obtidos, *Pseudonocardia carboxydivorans* isolada da esponja *Rhabdastrella globostellata* inibiu um isolado clínico de *S. aureus* resistente a clindamicina, ciprofloxacina, eritromicina, lincomicina e amoxicilina.

Todos esses trabalhos, em combinação com os resultados apresentados aqui, mostram como actinobactérias ainda são capazes de produzir moléculas antimicrobianas eficazes, e destacam o importante papel das actinobactérias simbióticas nesse contexto. Como próximos passos do trabalho, é essencial a identificação molecular (a nível de gênero, no mínimo) da coleção por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, a fim de se ter uma melhor visão dos diversos gêneros que foram armazenados na coleção e conhecer quais gêneros de actinobactérias do intestino do camarão são cultiváveis. Além disso, seria importante tentar extrair os metabólitos bioativos e fazer um *screening* quantitativo por métodos como concentração inibitória mínima para quantificar o isolado com maior potencial antimicrobiano e com possibilidade de ser encaminhado para análises metabolômicas de seus extratos.

6 CONCLUSÃO

A caracterização cultural das 24 actinobactérias da coleção "Shrimp Gut Actinobacteria" (SGA) revelou uma diversidade de cores do micélio aéreo e reverso como verde, laranja, amarelo e cinza. A morfologia das cadeias de esporos mostrou predominância do tipo *flexibilis* (58,3%), seguida por *retinaculum-apertum* e *rectus* (16,6% cada). Além disso, quatro isolados não apresentaram formação de filamentos, exibindo morfologias cocoides e bacilares, e nenhum isolado apresentou morfologia *spira*, típica de *Streptomyces*, o que sugere a presença de gêneros raros de actinobactérias e corrobora com a hipótese de que a coleção SGA pode conter microrganismos pouco explorados.

No teste de atividade antimicrobiana pelo método do *cross-streak*, cinco isolados demonstraram capacidade de inibição contra patógenos de importância clínica. O isolado SGA-18 destacou-se por inibir todos os patógenos testados, sendo a única a inibir *Salmonella enterica* e *Klebsiella pneumoniae*, enquanto o isolado SGA-05 inibiu todas as outras cinco bactérias indicadoras. Esses resultados reforçam o potencial das actinobactérias como produtoras de compostos antimicrobianos de amplo espectro, capazes de atuar tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas.

Esses achados abrem portas para possíveis estudos futuros focados na identificação e purificação dos compostos bioativos produzidos pelo isolado SGA18, bem como a purificação e prospecção de atividades biológicas dos pigmentos da coleção como um todo. Além disso, a investigação das condições de cultivo que maximizam a produção desses metabólitos pode ser fundamental para viabilizar sua aplicação em escala industrial. Portanto, este estudo não apenas evidencia a riqueza metabólica das actinobactérias presentes no microbioma de camarões, mas também ressalta a importância de explorar ambientes não convencionais para a descoberta de novos agentes antimicrobianos, contribuindo para o combate à RAM a confirmando a posição do filo Actinobacteria na linha de frente da produção de agentes antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, O. *et al.* Evaluating the antagonistic potential of actinomycete strains isolated from Sudan's soils against *Phytophthora infestans*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 13, p. 827824, 29 jun. 2022.
- ABUSHAHEEN, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, St. Louis, Missouri, v. 66, n. 6, p. 100971, jun. 2020.
- AJULO, S.; AWOSILE, B. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS 2022): Investigating the relationship between antimicrobial resistance and antimicrobial consumption data across the participating countries. **PLOS ONE**, California, USA, v. 19, n. 2, p. e0297921, 5 fev. 2024.
- AL-ANSARI, M. *et al.* Antimicrobial potential of *Streptomyces* sp. to the Gram positive and Gram negative pathogens. **Journal of Infection and Public Health**, London, v. 12, n. 6, p. 861–866, nov. 2019.
- ALENAZI, A. M. *et al.* A review on Actinomycetes distribution, isolation, and their medical applications. **Novel Research in Microbiology Journal**, Egypt, v. 7, n. 2, p. 1918–1931, 6 abr. 2023.
- AL-SHAIBANI, M. M. *et al.* Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from Phylum Actinobacteria and Its therapeutic applications. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 26, n. 15, p. 4504, 26 jul. 2021.
- AMIIN, M. K. *et al.* The role of probiotics in vannamei shrimp aquaculture performance – A review. **Veterinary World**, Wankaner, India, p. 638–649, mar. 2023.
- AMIN, D. H. *et al.* Microbiological and molecular insights on rare actinobacteria harboring bioactive prospective. **Bulletin of the National Research Centre**, Germany, v. 44, n. 1, p. 5, dez. 2020.
- ANTENEH, Y. S.; FRANCO, C. M. M. Symbiosis and pathogenicity of Actinobacteria. In: WINK, J.; MOHAMMADIPANAH, F.; HAMED, J. (Eds.). **Biology and Biotechnology of Actinobacteria**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 233–268.
- ASGHAR, A. *et al.* An insights into emerging trends to control the threats of antimicrobial resistance (AMR): an address to public health risks. **Archives of Microbiology**, Germany, v. 206, n. 2, p. 72, fev. 2024.
- BAIG, U. *et al.* Phylogenetic diversity and activity screening of cultivable actinobacteria isolated from marine sponges and associated environments from the western coast of India. **Access Microbiology**, United Kingdom, v. 3, n. 9, 23 set. 2021.
- BALAGURUNATHAN, R. *et al.* Sample collection, isolation, and diversity of Actinobacteria. In: BALAGURUNATHAN, Ramasamy *et al.* **Protocols in Actinobacterial research**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 1-24.
- BANDEIRA, L. *et al.* Metabarcoding expands knowledge on diversity and ecology of rare actinobacteria in the Brazilian Cerrado. **Folia Microbiologica**, Netherlands, 3 jul. 2024.

- BARKA, E. A. *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, United States, v. 80, n. 1, p. 1–43, mar. 2016.
- BARLOW, M. What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer. *in*: GOGARTEN, M. B.; GOGARTEN, J. P.; OLENDZENSKI, L. C. (Eds.). Horizontal Gene Transfer. **Methods in Molecular Biology**. Totowa, v. 532p. 397–411, 2009.
- BASRA, P. *et al.* Fitness tradeoffs of antibiotic resistance in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 667–679, fev. 2018.
- BECERRIL-ESPINOSA, A. *et al.* Dry stamping coral powder: An Effective method for isolating coral symbiotic actinobacteria. **Microorganisms**, Basel, Switzerland, v. 11, n. 12, p. 2951, 10 dez. 2023.
- BIONDO, C. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. **Pathogens**, Basel, Switzerland, v. 12, n. 1, p. 116, 10 jan. 2023.
- BOOPATHI, S.; LIU, D.; JIA, A.-Q. Molecular trafficking between bacteria determines the shape of gut microbial community. **Gut Microbes**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 1959841, 1 jan. 2021.
- BORODOVICH, T. *et al.* Phage-mediated horizontal gene transfer and its implications for the human gut microbiome. **Gastroenterology Report**, Oxford, v. 10, p. goac012, 25 jan. 2022.
- BOUBEKRI, K. *et al.* Multifunctional role of actinobacteria in agricultural production sustainability: A review. **Microbiological Research**, Netherlands, v. 261, p. 127059, ago. 2022.
- BRITO, F. A. E. *et al.* Actinobactérias do solo rizosférico no bioma Caatinga. **Enciclopédia Biosfera**, Jandaia-Go, v. 11, n. 21, p. 1992-2004, 2015.
- BROWN, K. *et al.* Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 12–24, jan. 2017.
- BROWNE, K. *et al.* A New era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, Switzerland, v. 21, n. 19, p. 7047, 24 set. 2020.
- BRUCKER, R. M.; BORDENSTEIN, S. R. Speciation by symbiosis. **Trends in Ecology & Evolution**, United Kingdom, v. 27, n. 8, p. 443–451, ago. 2012.
- CABEZÓN, E.; DE LA CRUZ, F.; ARECHAGA, I. Conjugation inhibitors and their potential use to prevent dissemination of antibiotic resistance genes in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 8, p. 2329, 30 nov. 2017.
- CHAKRABORTY, I. *et al.* Isolation and characterization of pigment producing marine *Actinobacteria* from mangrove soil and applications of bio-pigments. **Der Pharmacia Lettre**, Vienna, Austria, v. 7, n. 4, p. 93-100, 2015.
- CHAUDHARY, D. K. *et al.* Unveiling the bacterial community across the stomach, hepatopancreas, anterior intestine, and posterior intestine of pacific whiteleg *Shrimp*. **Journal**

of **Microbiology and Biotechnology**, South Korea, v. 34, n. 6, p. 1260–1269, 28 jun. 2024.

CHEN, Y. *et al.* Retrospect of fish meal substitution in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feed: Alternatives, limitations and future prospects. **Reviews in Aquaculture**, Australia, v. 16, n. 1, p. 382–409, jan. 2024.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, United States, v. 12, n. 1, p. 547–569, 31 dez. 2021.

CIAPPONI, A. *et al.* Systematic review and meta-analysis of deaths attributable to antimicrobial resistance, Latin America. **Emerging Infectious Diseases**, United States, v. 29, n. 11, nov. 2023.

COLAVECCHIO, A. *et al.* Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the Enterobacteriaceae family – A Review. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 8, p. 1108, 20 jun. 2017.

CORRÊA, J. S. *et al.* The governance of antimicrobial resistance in Brazil: Challenges for developing and implementing a one health agenda. **Global Public Health**, United States, v. 18, n. 1, p. 2190381, 2 jan. 2023.

COSENTINO, F.; VIALE, P.; GIANNELLA, M. MDR/XDR/PDR or DTR? Which definition best fits the resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa*? **Current Opinion in Infectious Diseases**, United States, v. 36, n. 6, p. 564–571, dez. 2023.

CUNHA, B. R.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? **Antibiotics**, Basel, Switzerland, v. 8, n. 2, p. 45, 24 abr. 2019.

DAI, W.-F. *et al.* Starvation stress affects the interplay among shrimp gut microbiota, digestion and immune activities. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 80, p. 191–199, set. 2018.

DAS, R. *et al.* Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. **BMC Microbiology**, London, v. 18, n. 1, p. 71, dez. 2018.

DAT, T. T. H. *et al.* Bacteria cultivated from sponges and bacteria not yet cultivated from sponges—A Review. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 12, p. 737925, 10 nov. 2021.

DELBARI, Y. *et al.* Identification and anti-bacterial property of endophytic actinobacteria from *Thymes kotschyanus*, *Allium hooshidaryae*, and *Cerasus microcarpa*. **Scientific Reports**, New York, v. 13, n. 1, p. 13145, ago. 2023.

DENISSEN, J. *et al.* Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Netherlands, v. 244, p. 114006, jul. 2022.

DJORDJEVIC, S. P. *et al.* Genomic surveillance for antimicrobial resistance — a One Health perspective. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 25, n. 2, p. 142–157, fev. 2024.

DORNELAS, J. C. M. *et al.* Research article characterization and phylogenetic affiliation of

actinobacteria from tropical soils with potential uses for agro-industrial processes. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, Brazil, v. 16, n. 3, 2017.

EZEObIORA, C. E. *et al.* Uncovering the biodiversity and biosynthetic potentials of rare actinomycetes. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, Egypt, v. 8, n. 1, p. 23, dez. 2022.

FATIMA, A. *et al.* Spore forming Actinobacterial diversity of cholistan desert Pakistan: Polyphasic taxonomy, antimicrobial potential and chemical profiling. **BMC Microbiology**, London, v. 19, n. 1, p. 49, dez. 2019.

FERNANDES, C. J. *et al.* Isolation and identification of pigment producing actinomycete *Saccharomonospora azurea* SJCJABS01. **Biomedical and Pharmacology Journal**, India, v. 14, n. 4, p. 2261–2269, dez. 2021.

FIGUEREDO, A. *et al.* The Pacific white shrimp, the most cultivated shrimp species, is it *Litopenaeus* or *Penaeus vannamei*? **Reviews in Aquaculture**, Australia, v. 15, n. 1, p. 7–13, jan. 2023.

FILE, T. M. Overview of Resistance in the 1990s. **Chest**, Philadelphia, v. 115, n. 3, p. 3S-8S, mar. 1999.

FITRI, L. *et al.* Isolation and characterization of soil *Actinobacteria* as cellulolytic enzyme producer from Aceh Besar, Indonesia. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, Indonesia, v. 22, n. 11, nov. 2021.

FLEMING, A. **Penicillin**. Nobel Lecture, 1945.

FREI, A. *et al.* Metal complexes as a promising source for new antibiotics. **Chemical Science**, Washington, D.C, v. 11, n. 10, p. 2627–2639, 2020.

GABASHVILI, E. *et al.* Phage transduction is involved in the intergeneric spread of antibiotic resistance-associated bla_{CTX-M}, mel, and tetM loci in natural populations of some human and animal bacterial pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 77, n. 2, p. 185–193, fev. 2020.

GEBREYOHANNES, G. *et al.* Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Netherlands, v. 3, n. 6, p. 426–435, jun. 2013.

GLUKHOVA, A. A. *et al.* Antibiotic activity of actinobacteria from the digestive tract of millipede *Nedyopus dawydoffiae* (Diplopoda). **Antibiotics**, Basel, Switzerland, v. 7, n. 4, p. 94, out. 2018.

GONZÁLEZ-SALAZAR, L. A. *et al.* Biosynthetic novelty index reveals the metabolic potential of rare actinobacteria isolated from highly oligotrophic sediments. **Microbial Genomics**, United Kingdom, v. 9, n. 1, jan. 2023.

GORDON, R. E.; SMITH, M. M. Proposed group of characters for the separation of *Streptomyces* and *Nocardia*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 69, n. 2, p. 147–150, fev. 1955.

GRAF, F. E. *et al.* Inhibiting conjugation as a tool in the fight against antibiotic resistance. **Drug Development Research**, United States, v. 80, n. 1, p. 19–23, fev. 2019.

HAMASALIH, B. M. *et al.* Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* (HVISA) at a Tertiary Hospital in Malaysia. **Sains Malaysiana**, Malaysia, v. 51, n. 3, p. 795 – 801, 31 mar. 2022.

HAMED, J.; POORINMOHAMMAD, N.; PAPIRAN, R. Growth and Life Cycle of Actinobacteria. In: HAMED, J.; POORINMOHAMMAD, N.; PAPIRAN, R. **Biology and Biotechnology of Actinobacteria**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 29-50.

HAZARIKA, S. N.; THAKUR, D. *Actinobacteria*. In: AMARESAN, N. *et al.* (ed), **Beneficial microbes in agro-Ecology**. Switzerland: Elsevier, 2020. p. 443–476.

HEGEMANN, J. D. *et al.* Current developments in antibiotic discovery: Global microbial diversity as a source for evolutionary optimized anti-bacterials. **EMBO reports**, Heidelberg, Germany, v. 24, n. 1, p. e56184, jan. 2023.

HEMBROM, P. S. *et al.* Influence of gut microbiome on health and development of penaeid shrimps. **Aquatic Sciences**, Heidelberg, Germany, v. 86, n. 1, p. 4, jan. 2024.

HERREN, C. M.; BAYM, M. Decreased thermal niche breadth as a trade-off of antibiotic resistance. **The ISME Journal**, United Kingdom, v. 16, n. 7, p. 1843–1852, jul. 2022.

HOBSON, C.; CHAN, A. N.; WRIGHT, G. D. The Antibiotic resistome: A guide for the discovery of natural products as antimicrobial agents. **Chemical Reviews**, Washington, DC, v. 121, n. 6, p. 3464–3494, mar. 2021.

HOLT, C. C. *et al.* Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 186, p. 107387, nov. 2021.

HU, D. *et al.* Exploring the potential of antibiotic production from rare actinobacteria by Whole-Genome sequencing and Guided MS/MS analysis. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 11, p. 1540, jul. 2020.

HUI, M. L.-Y. *et al.* The Extremophilic Actinobacteria: From microbes to Medicine. **Antibiotics**, Basel, Switzerland, v. 10, n. 6, p. 682, jun. 2021.

IBNOUF, E. O.; ALDAWSARI, M. F.; ALI WAGGIALLAH, H. Isolation and extraction of some compounds that act as antimicrobials from actinomycetes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Saudi Arabia, v. 29, n. 8, p. 103352, ago. 2022.

ILIC, S. B. *et al.* Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. **Microbiology**, São Paulo, Brasil, v. 76, n. 4, p. 421–428, ago. 2007.

JAGANNATHAN, S. V. *et al.* Marine actinomycetes, new sources of biotechnological products. **Marine Drugs**, China, v. 19, n. 7, p. 365, 25 jun. 2021.

JIANG, Q. *et al.* Effects and relevant mechanisms of non-antibiotic factors on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in water environments: A review. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 806, p. 150568, fev. 2022.

- JIN, M. *et al.* Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation. **The ISME Journal**, United Kingdom, v. 14, n. 7, p. 1847–1856, 1 jul. 2020.
- JONES, S. E.; ELLIOT, M. A. ‘Exploring’ the regulation of *Streptomyces* growth and development. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 42, p. 25–30, abr. 2018.
- JOSE, P. A.; MAHARSHI, A.; JHA, B. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. **Microbiological Research**, China, v. 246, p. 126708, maio. 2021.
- KAMAL, S. *et al.* Risk factors and clinical characteristics of Pandrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Cureus**, San Francisco, California, v.16, n.4 abr. 2024.
- KRELL, T.; MATILLA, M. A. *Pseudomonas aeruginosa*. **Trends in Microbiology**, United Kingdom, v. 32, n. 2, p. 216–218, fev. 2024.
- KURNIANTO, M. A.; KUSUMANINGRUM, H. D.; LIOE, H. N. Characterization of *Streptomyces* isolates associated with estuarine fish *Chanos chanos* and Profiling of Their Antibacterial Metabolites-Crude-Extract. **International Journal of Microbiology**, Egypt, v. 2020, p. 1–12, set. 2020.
- LACERDA, L. D. *et al.* 20-Years cumulative impact from shrimp farming on mangroves of Northeast Brazil. **Frontiers in Forests and Global Change**, Lausanne, Switzerland, v. 4, p. 653096, abr. 2021.
- LAI, C.-C. *et al.* Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v. 57, n. 4, p. 106324, abr. 2021.
- LAW, J. W.-F. *et al.* The Rising of modern Actinobacteria Era. **Progress In Microbes & Molecular Biology**, Malaysia, v. 3, n. 1, mar. 2020.
- LEE, L.-H.; GOH, B.-H.; CHAN, K.-G. Editorial: Actinobacteria: prolific producers of bioactive metabolites. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 11, p. 1612, ago. 2020.
- LEÓN-BUITIMEA, A. *et al.* The Demand for new antibiotics: Antimicrobial Peptides, nanoparticles, and combinatorial therapies as future strategies in Antibacterial agent design. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 11, p. 1669, jul. 2020.
- LI, E. *et al.* Gut Microbiota and its modulation for healthy farming of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, United Kingdom, v. 26, n. 3, p. 381-399, jul. 2018.
- LI, F. *et al.* Distribution and Management of Residual Antibiotics in the *Litopenaeus vannamei* Shrimp Farming Environment: Recommendations for Effective Control. **Fishes**, Basel, Switzerland, v. 9, n. 3, p. 84, 23 fev. 2024.
- LI, H. *et al.* Influence of microplastics on the growth and the intestinal microbiota composition of brine shrimp. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 12, p. 717272, set. 2021a.

- LI, X. *et al.* Chemical and quality evaluation of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Influence of strains on flesh nutrition. **Food Science & Nutrition**, Colorado, v. 9, n. 10, p. 5352–5360, out. 2021b.
- LI, F. *et al.* Sources, distribution and dynamics of antibiotics in *Litopenaeus vannamei* farming environment. **Aquaculture**, Asia, v. 545, p. 737200, dez. 2021c.
- LI, Y. *et al.* Isolation of *Enterococcus faecium* with Feeding Attractant Function from Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Intestine. **Journal of Ocean University of China**, Qingdao, China, v. 19, n. 4, p. 931–940, ago. 2020.
- LIU, F. *et al.* Current examining methods and mathematical models of horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the environment. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 15, p. 1371388, abr. 2024a.
- LIU, Q. *et al.* Diversity, antibacterial and phytotoxic activities of actinomycetes associated with *Periplaneta fuliginosa*. **PeerJ**, Condado de Marin, v. 12, p. e18575, nov. 2024b.
- LIU, G.; THOMSEN, L. E.; OLSEN, J. E. Antimicrobial-induced horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: a mini-review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, United Kingdom, v. 77, n. 3, p. 556–567, fev. 2022.
- LONG, Y. *et al.* Diversity and antimicrobial activities of culturable actinomycetes from *Odontotermes formosanus* (Blattaria: Termitidae). **BMC Microbiology**, London, v. 22, n. 1, p. 80, dez. 2022.
- LU, J. *et al.* Triclosan at environmental concentrations can enhance the spread of extracellular antibiotic resistance genes through transformation. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 713, p. 136621, abr. 2020.
- MA, T.; MCALLISTER, T. A.; GUAN, L. L. A review of the resistome within the digestive tract of livestock. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, United Kingdom, v. 12, n. 1, p. 121, nov. 2021.
- MAGIORAKOS, A.-P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, Switzerland, v. 18, n. 3, p. 268–281, mar. 2012.
- MANIKKAM, R. *et al.* Existence of rare actinobacterial forms in the Indian sector of Southern Ocean: 16 S rRNA based metabarcoding study. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, Brazil, v. 55, n. 3, p. 2363–2370, set. 2024.
- MCINNES, R. S. *et al.* Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, England, v. 53, p. 35–43, fev. 2020.
- MEHDI, Y. *et al.* Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. **Animal Nutrition**, United States, v. 4, n. 2, p. 170–178, jun. 2018.
- MICHAELIS, C.; GROHMANN, E. Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Biofilms. **Antibiotics**, Basel, Switzerland, v. 12, n. 2, p. 328, fev. 2023.

- MIETHKE, M. *et al.* Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. **Nature Reviews Chemistry**, United Kingdom, v. 5, n. 10, p. 726–749, ago. 2021.
- MOELLERING, R. C. Discovering new antimicrobial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v. 37, n. 1, p. 2–9, jan. 2011.
- MOHSENI, M. *et al.* Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the Caspian Sea. **Int J Mol Cell Med**, Babol, Iran, v. 2, n. 2, p. 64–71, 2013.
- MOLINA-SANTIAGO, C.; BERNAL, P. Nanotube-mediated plasmid transfer as a natural alternative for the improvement of industrially relevant bacteria. **Microbial Biotechnology, Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 706–708, abr. 2023.
- MONDAL, R. K. *et al.* AVR/I/SSAPDB: a comprehensive & specialised knowledgebase of antimicrobial peptides to combat VRSA, VISA, and VSSA. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 40, n. 11, p. 348, nov. 2024.
- MORRISON, L.; ZEMBOWER, T. R. Antimicrobial Resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, Philadelphia, v. 30, n. 4, p. 619–635, out. 2020.
- MOUTON, J. W. Controlling antimicrobial resistance: Interfering in the process of natural selection. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, Buenos Aires, v. 2, n. 1, p. 32, 2013.
- MURPHY, R. *et al.* Comparative Genomics Reveals Prophylactic and Catabolic Capabilities of Actinobacteria within the Fungus-Farming Termite Symbiosis. **mSphere**, v. 6, n. 2, p. e01233-20, abr. 2021.
- NGAMCHARUNGCHIT, C. *et al.* Bioactive Metabolites from Terrestrial and Marine Actinomycetes. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 28, n. 15, p. 5915, ago. 2023.
- NOFIANI, R.; RIZKY, R.; BRILLIANTORO, R. Antibacterial Activities and Toxicity of *Streptosporangium* sp. SM1P. **Molekul**, Indonesia, v. 16, n. 3, p. 210, nov. 2021.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Antimicrobial resistance**. 21 nov. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 18 mar. 2025.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Country, territory or area profiles**. Disponível em: https://worldhealthorg.shinyapps.io/glass-dashboard/_w_20c5900b/#!/cta-profiles. Acesso em: 6 jun. 2024.
- OSSAI, J. *et al.* Renewed interests in the discovery of bioactive actinomycete metabolites driven by emerging technologies. **Journal of Applied Microbiology**, United Kingdom, v. 132, n. 1, p. 59–77, jan. 2022.
- PARRA, J. *et al.* Antibiotics from rare actinomycetes, beyond the genus *Streptomyces*. **Current Opinion in Microbiology**, Netherlands, v. 76, p. 102385, dez. 2023.
- PHUONG, T. V.; DIEP, C. N. Isolation and Selection of Actinobacteria Against Pathogenic Bacteria From Shrimp Pond Water on Duyen Hai District, Tra Vinh Province, Vietnam.

International Journal of Environmental & Agriculture Research, Bikaner, v. 6, n. 8, [s.d.].

PILLONETTO, M. *et al.* The Experience of implementing a national antimicrobial resistance surveillance system in Brazil. **Frontiers in Public Health**, Lausanne, Switzerland, v. 8, p. 575536, jan. 2021.

PROTASOV, E. S. *et al.* Diversity of culturable actinobacteria associated with deepwater endemic amphipods of Lake Baikal and study of their biosynthetic capabilities. **Limnology**, Toulouse, France, v. 21, n. 1, p. 35–47, jan. 2020.

PULINGAM, T. *et al.* Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Netherlands, v. 170, p. 106103, mar. 2022.

RATTE, M.; BATUBARA, I.; LESTARI, Y. Morphological characterization and antioxidant activity of actinobacteria from *Xylocarpus granatum* growing in mangrove habitat. **Biotropika: Journal of Tropical Biology**, Brawijaya in Indonesia, v. 10, n. 1, p. 1–10, 30 mar. 2022.

REBOUÇAS, R. H. *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. **Environmental Research**, Maryland, v. 111, n. 1, p. 21 – 24, jan. 2011.

RIBEIRO, I. *et al.* Actinobacteria from arctic and atlantic deep-sea sediments—Biodiversity and bioactive potential. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 14, p. 1158441, 30 mar. 2023.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. Symbiosis and development: The hologenome concept. Birth defects research Part C: **Embryo Today: Reviews**, Hoboken, New Jersey, v. 93, n. 1, p. 56–66, mar. 2011.

SALWAN, R.; SHARMA, V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. **Microbiological Research**, China, v. 231, p. 126374, jan. 2020.

SAMANTA, T. T.; DAS, A. Isolation, identification, and characterization of gut microflora of *Perionyx excavatus* collected from Midnapore, West Bengal. **Journal of Basic Microbiology**, Hoboken, New Jersey, v. 56, n. 3, p. 286–293, mar. 2016.

SAMREEN, *et al.* Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Amsterdam, v. 27, p. 101–111, dez. 2021.

SANTAMARÍA, R. I. *et al.* Characterization of actinomycetes strains isolated from the intestinal tract and feces of the larvae of the longhorn beetle *Cerambyx welensii*. **Microorganisms**, Basel, Switzerland, v. 8, n. 12, p. 2013, dez. 2020.

SANTOS, F. *et al.* Morphology of actinobacteria strains of areas susceptible to desertification. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 16, n. 29, p. 1911–1924, 30 jun. 2019.

SEIPKE, R. F.; KALTENPOTH, M.; HUTCHINGS, M. I. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 862–876, jul. 2012.

SELIM, M. S. M.; ABDELHAMID, S. A.; MOHAMED, S. S. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, Dordrecht, Netherlands, v. 19, n. 1, p. 72, dez. 2021.

SELVARAJ, J. N. *et al.* Statistical optimization of media components for antibiotic production in *Streptomyces* sp. CMSTAAHAL-3. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 65, p. 1–13, set. 2023.

SETIAWAN, A. *et al.* Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste Using *Pseudonocardia carboxydvorans* 18A13O1 to Produce Bioactive Metabolites. **Fermentation**, Basel, Switzerland, v. 7, n. 4, p. 247, 29 out. 2021.

SEVERN, M. M.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. **Nature Reviews Microbiology**, United Kingdom, v. 21, n. 2, p. 97–111, fev. 2023.

SHEPHERD, M. D. *et al.* Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. **Current Protocols in Microbiology**, United States, v. 18, n. 1, ago. 2010.

SHEPHERDSON, E. M. F. *et al.* Exploratory growth in *Streptomyces venezuelae* involves a unique transcriptional program, enhanced oxidative stress response, and profound acceleration in response to glycerol. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 204, n. 4, p. e00623-21, abr. 2022.

SHEPHERDSON, E. M. F.; ELLIOT, M. A. Cryptic specialized metabolites drive *Streptomyces* exploration and provide a competitive advantage during growth with other microbes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 119, n. 40, p. e2211052119, out. 2022.

SILVA, N. M. L. *et al.* Development and validation of a low-density SNP panel for paternity and kinship analysis and evaluation of genetic variability and structure of commercial Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) populations from Brazil. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 560, p. 738540, nov. 2022.

SIMEIS, D.; SERRA, S. Actinomycetes: A Never-Ending source of Bioactive Compounds—An overview on antibiotics production. **Antibiotics**, Basel, Switzerland., v. 10, n. 5, p. 483, abr. 2021.

SIRO, G. *et al.* Marine Actinomycetes associated with Stony Corals: A Potential hotspot for specialized metabolites. **Microorganisms**, Basel, Switzerland, v. 10, n. 7, p. 1349, jul. 2022.

SMITH, W. P. J. *et al.* Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 21, n. 8, p. 519–534, ago. 2023.

TANG, K. W. K.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Antimicrobial Resistance (AMR). **British Journal of Biomedical Science**, United Kingdom, v. 80, p. 11387, jun. 2023.

TERRENI, M.; TACCANI, M.; PREGNOLATO, M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 26, n. 9, p. 2671, maio 2021.

TROBOS, M. *et al.* Genomics of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*

from periprosthetic joint infections and correlation to clinical outcome. **Microbiology Spectrum**, United States, v. 10, n. 4, p. e02181-21, ago. 2022.

TZUC, J. T. *et al.* Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **SpringerPlus**, Berlin, v. 3, n. 1, p. 280, dez. 2014.

UESUGI, J. H. E. *et al.* Morphological diversity of actinobacteria isolated from oil palm compost (*Elaeis guineensis*). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 455–469, mar. 2024.

UNNI, S.; SIDDIQUI, T. J.; BIDAISEE, S. Reduced Susceptibility and Resistance to Vancomycin of *Staphylococcus aureus*: A Review of Global Incidence Patterns and Related Genetic Mechanisms. **Cureus**, San Francisco, California, 20 out. 2021.

URTGAM, S.; THURNKUL, N.; SUMPRADIT, T. Isolation, identification, and application of pigment-producing actinobacteria from stingless bee hives for handicraft production. **Journal of Current Science and Technology**, Thailand, v. 13, n. 3, p. 564–573, 30 ago. 2023.

VALENTI, W. C. *et al.* Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, Netherlands, v. 19, p. 100611, mar. 2021.

VAN BERGEIJK, D. A. *et al.* Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 18, n. 10, p. 546–558, out. 2020.

VELAZQUEZ-MEZA, M. E. *et al.* Antimicrobial resistance: One health approach. **Veterinary World**, Chandrapur Road, p. 743–749, mar. 2022.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and pond environment in northeastern Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B.**, United States, v. 45, n. 3, p. 198-203, 2010

VIGNESH, A. *et al.* Bioactive potential of actinobacteria isolated from the gut of marine fishes. **Indian J. Mar. Sci.**, Indian, v. 48, n. 8, 2019.

VON WINTERSDORFF, C. J. H. *et al.* Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 7, fev. 2016.

WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC v. 40, n. 4, p. 581–600, out. 1940.

WALESCH, S. *et al.* Fighting antibiotic resistance-strategies and (pre)clinical developments to find new antibacterials. **EMBO reports**, Heidelberg, v. 24, n. 1, p. e56033, jan. 2023.

WALSH, C. Where will new antibiotics come from? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 1, n. 1, p. 65–70, out. 2003.

WANG, Y. *et al.* Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation. **The ISME Journal**, United

Kingdom, v. 14, n. 8, p. 2179–2196, ago. 2020.

WANG, Y. *et al.* Non-antibiotic pharmaceuticals promote the transmission of multidrug resistance plasmids through intra- and intergenera conjugation. **The ISME Journal**, United Kingdom, v. 15, n. 9, p. 2493–2508, set. 2021.

WATSON, B. N. J.; STAALS, R. H. J.; FINERAN, P. C. CRISPR-Cas-Mediated phage resistance enhances horizontal gene transfer by transduction. **mBio**, Washington, D.C, v. 9, n. 1, p. e02406-17, 7 mar. 2018.

WINK, J. M. **Methods for the taxonomic description of the Actinobacteria**. 2012.

Disponível em: https://www.dsmz.de/microorganisms/wink_pdf/Actinomethods.pdf. Acesso em: 26 maio 2023.

WOODRUFF, H. B. Selman A. Waksman, Winner of the 1952 Nobel Prize for Physiology or Medicine. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 80, n. 1, p. 2–8, jan. 2014.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome. **Expert Opinion on Drug Discovery**, United Kingdom, v. 5, n. 8, p. 779–788, ago. 2010.

XIE, F.; PATHOM-AREE, W. Actinobacteria from desert: diversity and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 12, p. 765531, 9 dez. 2021.

XIONG, J. *et al.* Spatiotemporal successions of shrimp gut microbial colonization: high consistency despite distinct species pool. **Environmental Microbiology**, Hoboken, New Jersey, v. 21, n. 4, p. 1383–1394, abr. 2019.

YEKANI, M. *et al.* Collateral sensitivity: An evolutionary trade-off between antibiotic resistance mechanisms, attractive for dealing with drug-resistance crisis. **Health Science Reports**, Hoboken, New Jersey, v. 6, n. 7, p. e1418, jul. 2023.

YOU, J. L. *et al.* Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 21, n. 5, p. 679 – 682, jul. 2005.

YU, Z. *et al.* Artificial sweeteners stimulate horizontal transfer of extracellular antibiotic resistance genes through natural transformation. **The ISME Journal**, United Kingdom, v. 16, n. 2, p. 543–554, fev. 2022.

ZHANG, C. *et al.* Burden of infectious diseases and bacterial antimicrobial resistance in China: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. **The Lancet Regional Health - Western Pacific**, London, v. 43, p. 100972, fev. 2024.

ZHANG, Y. *et al.* Bacteriophages: Underestimated vehicles of antibiotic resistance genes in the soil. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 13, p. 936267, ago. 2022.

ZHOU, Z. *et al.* Segmental variations in intestinal microbiota composition and functional capacity along the digestive tract of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Reports**, Netherlands, v. 34, p. 101922, fev. 2024.

ZHU, Y.; HUANG, W. E.; YANG, Q. Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria. **Infection and Drug Resistance**, United Kingdom, v. 15, p. 735–746, mar. 2022.

ZOTHANPUIA *et al.* Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. **Microbial Cell Factories**, United Kingdom, v. 17, n. 1, p. 68, dez. 2018.