

## ESTUDO DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PRODUZIDOS POR *STREPTOMYCES* SP . 1S

SALAMONI, Sabrina Pinto\*; GERMANI, José Carlos\*\*; VAN DER SAND; Sueli Teresinha\*\*\*

### Resumo

Em um estudo preliminar de avaliação da atividade antimicrobiana, um isolado de *Streptomyces* caracterizado como linhagem 1S foi selecionado em decorrência do seu alto potencial como produtor de metabólitos bioativos. Este isolado apresentou um amplo espectro de atividade inibindo 46 dos 54 microrganismos-alvos (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos). No presente estudo, foi avaliada a influência das condições ambientais como meio de cultivo, temperatura de incubação, cultivo estático ou com agitação e tempo de crescimento para a produção de moléculas bioativas. Para tanto, foram utilizados sete meios de cultura: caldo amido caseína (AC); caldo Czapeck Dox modificado (CPD); meio proposto por Sahin (S); meio Bennett's (B); caldo nutritivo (CN); meio extrato de malte e levedura (ISP2) e caldo tripticaseína de soja (TSB). As temperaturas avaliadas foram 28, 30, 35 e 40 °C. Para cada um dos ensaios foi determinada a atividade antimicrobiana, o pH e a biomassa celular. Das condições de cultivo avaliadas, a melhor atividade antimicrobiana foi observada nos extratos provenientes do crescimento de *Streptomyces* sp. 1S no meio de cultura ISP2, a uma temperatura de 28 °C e com 96 horas de cultivo. Nestas condições, o isolado inibiu 15, dos 17 microrganismos-alvo empregados neste estudo, incluindo microrganismos multirresistentes como *Staphylococcus aureus* MRSA, *Enterococcus* sp. e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis.

Palavras-chave: *Streptomyces*. Atividade antimicrobiana. Resistência. Compostos bioativos.

\* Laboratório de Avaliação de Moléculas Sintéticas e Naturais com Atividade Biológica, Núcleo Biotecnológico, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira, SC, Brasil, Rua Paese, 198, Universitário 89560-000 – Videira, SC, Brasil; sabrina.salamoni@unoesc.edu.br

\*\* Laboratório de Tecnologia Bioquímica, Departamento de Produção de Matéria-Prima; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produção de Matéria Prima, Av. Ipiranga 2752, Lab. 707, Santana, 90610-000 – Porto Alegre, RS, Brasil; germani@ufrgs.br; germani@farmacia.ufrgs.br

\*\*\* Laboratório de Microbiologia Ambiental, Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia. Rua Sarmento Leite 500, Centro, 90050-170 – Porto Alegre, RS, Brasil; svands@ufrgs.br

## ***Production of compounds with antimicrobial activity by Streptomyces IS***

### ***Abstract***

*In a preliminary study of antimicrobial activity, the isolate Streptomyces sp. IS was selected to its high potential as bioactive metabolites producer. This isolate showed a broad spectrum of activity, inhibiting 46 out of 54 test microorganisms used in the assay (gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts and filamentous fungi). In this study it was evaluated the influence of environmental conditions such as culture medium, temperature of incubation, agitated or static culture and time of growth for production of bioactive molecules. Therefore, we used seven media: starch casein broth (SC), medium proposed by Sahin (S), Bennett's medium (B), nutrient broth (NB), medium malt and yeast extract (ISP2) and trypticase soy broth (TSB) and modified Czapeck Dox broth (CPD). The temperatures evaluated 28, 30, 35 and 40 °C, on stirring and static culture. For each test the antimicrobial activity was determined, pH and cell biomass. From all assays performed, the best condition for antimicrobial production was observed from extracts that resulted from the growth of Streptomyces sp. IS in ISP2 medium, at a temperature of 28 °C, for 96 hours of culture under agitation. The extract obtained inhibited 15 of the 17 test microorganisms used in this study, including multiresistant microorganisms such as Staphylococcus aureus MRSA, Enterococcus sp. and Salmonella enterica subsp. enterica Enteritidis.*

*Keywords: Streptomyces. Antimicrobial activity. Multiresistant. Production.*

## **1 INTRODUÇÃO**

Compostos antibacterianos e antifúngicos são amplamente empregados na terapia de humanos e outros animais e na agricultura para a proteção de plantas e sementes. Nas últimas décadas o aumento da resistência, em virtude da transferência e a disseminação de genes de resistência de microrganismos aos antibióticos comumente empregados na terapia humana, juntamente com a sensibilidade de pacientes (imunodeprimidos, portadores do vírus HIV, pacientes que permanecem por prolongado período internados) e a inabilidade para controlar certas doenças tem levado a contínuas pesquisas sobre novos metabólitos (ALANIS, 2005; MICHEL et al., 2006; FISCHBACH; WALSH, 2009).

Microrganismos procariotos produzem cerca de 50.000 compostos, destes, 22.000 apresentam alguma atividade biológica e cerca de 16.500 apresentam atividade antibiótica. Actinomicetales são responsáveis pela síntese de 45% destes metabólitos e, entre estes, o gênero *Streptomyces* produz cerca de 70-80%. Dos 16.500 antibióticos descobertos, somente cerca de 150 têm uso direto na medicina humana, veterinária e na agricultura (DEMAIN, 1998; CHALLIS; HOPWOOD, 2003; BERDY, 2005; EL-TARABITY; SIVASITHAMPARAM, 2006).

Os estreptomicetes são microrganismos Gram-positivos, apresentam um complexo ciclo de vida com diferenciação morfológica similar aos fungos filamentosos e são conhecidos por produzirem uma grande variedade de compostos biologicamente ativos com estrutura e mecanismos de ação distintos (AL TAI et al., 1999; LI et al., 2002; OSKAY; TAMER; AZERI, 2004; PANDEY; SHUKLA; MAJUMDAR, 2005; SHIOMI, 2005; XU et al., 2005).

No gênero *Streptomyces*, os antibióticos são produzidos em pequenas quantidades na fase de transição, isto é, no desenvolvimento inicial entre o micélio vegetativo e o aéreo. A sua produção é regulada por diferentes fatores físico-químicos, como a disponibilidade de nutrientes (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fosfato), de oxigênio, temperatura, taxa de crescimento, controle por *feedback*, inativação ou indução (DEMAIN, 1998; GUPTA; KUKARN; GANGULI, 2002; MARTIN, 2005). Para otimizar a produção desses fármacos, diferentes estudos tem sido realizados empregando o cultivo de *Streptomyces* em diferentes condições de crescimento como a fermentação sólida e líquida, em cultura estática ou sob agitação. Estes trabalhos têm demonstrado significativa influência das condições ambientais na biossíntese desses compostos (HASSAN; EL-NAGGAR; SAID, 2001; ASAGBRA; SANNI; OYEWEDE, 2005; PANDEY; SHUKLA, MAJUMDAR, 2005; NARAYANA; VIJAYALAKSHMI, 2008; THAKUR et al., 2009; SAJID et al., 2009).

Em um estudo preliminar (SALAMONI et al., 2010) de avaliação da atividade antimicrobiana, 25 isolados de *Streptomyces*, provenientes de processo de compostagem, foram avaliados quanto ao seu potencial de inibir diferentes microrganismos de interesse clínico e agrícola. Um isolado de *Streptomyces*, caracterizado como linhagem 1S, apresentou atividade antimicrobiana contra 14 bactérias Gram-positivas, 16 Gram-negativas, 4 leveduras e 12 fungos filamentosos. Este isolado foi o foco do presente estudo, considerando o potencial biotecnológico deste. Assim o objetivo foi avaliar a influência de diferentes condições ambientais como meio de cultivo, temperatura, pH condições de crescimento estático ou sob agitação e tempo de crescimento para a produção de moléculas bioativas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS ALVO

O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos do isolado 1S e dos microrganismos-teste (Tabela 1) foi avaliado pelo método de difusão em disco conforme determinado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Para este ensaio foram empregados 12 antimicrobianos: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), cefoxitina (30µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), norfloxacin (10µg), penicilina G (10UI), tetraciclina (30µg), trimetoprim (5µg), polimixina B (300 UI) e vancomicina (30µg).

Tabela 1 – Microrganismos-alvo empregados no ensaio com sobrenadante utilizando a técnica de difusão em poço

Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pectobacterium brasiliensis</i> **
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 33591	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 8668	<i>Ralstonia solanacearum</i> **
	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 13076
	<i>Salmonella Enteritidis</i> SE 86*
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> **
	Fungos
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Penicillium thomii</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Tricophyllum mentagrophytes</i>

American Type Culture Collection (ATCC); \*Amostra do Instituto de Ciências e Tecnologia dos Alimentos (ICTA/UFRGS); \*\*Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia (UFRGS); Coleção do Laboratório de Micologia ICBS/UFRGS. Todas as demais amostras são pertencentes à coleção do laboratório.

Fonte: os autores.

## 2.2 AVALIAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DA TEMPERATURA PARA A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

*Streptomyces* sp 1S foi cultivado por 10 dias em sete diferentes meios de cultura: caldo amido caseína (AC - 10 g Amido, 0,3 g caseína, 2 g NaCl, 2 g KNO<sub>3</sub>, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 g MgSO<sub>4</sub>, 0,01g FeSO<sub>4</sub>), caldo Czapeck Dox modificado (CpD - 30 g sacarose, 1 g NaCl, 2 g KNO<sub>3</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 0,05 g KCl, 0,01 g FESO<sub>4</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), meio proposto por Sahin (S - 0,8 g NaCl, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g KCl, 0,1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>, 0,04 g CaCl<sub>2</sub>, 2 g glicose, 3 g extrato de levedura), meio Bennett's (B - 2 g Peptona bacteriológica, 1 g extrato de levedura, 1 g extrato de carne, 10 g glicose, 0,05 g MgSO<sub>4</sub>), caldo nutritivo (CN - 1 g extrato de levedura, 5 g peptona bacteriológica, 1 g extrato de carne, 4 g NaCl), meio extrato de malte e levedura (ISP2 - 4 g extrato de levedura, 10 g extrato de malte, 4 g glicose) e caldo triptcaseína de soja (TSB). Erlemmeyers de 250 mL com 50 mL de cada meio de cultura foram inoculados com 10% do volume de uma cultura crescida por 48 horas. As culturas foram incubadas à temperatura de 28, 30, 35 e 40 °C, sob agitação constante de 150 r.p.m e em condições estáticas. A atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes* e *C. albicans* foi determinada em intervalos de 48 horas pela técnica da difusão em poço. A atividade antifúngica foi estipulada com as amostras do décimo dia de crescimento, em que foram empregados os microrganismos teste *P. thomii*, *F. oxysporium* e *T. mentagrophyte*.

### 2.2.1 Ensaio de atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em poços

A partir de placas previamente semeadas com o microrganismo-alvo (bactérias e levedura suspensão de 10<sup>8</sup> células/mL, fungos filamentosos suspensão 10<sup>6</sup> esporos/mL) foram recortados e removidos seis cilindros de 9 mm de diâmetro de cada placa. As culturas do isolado 1S, proveniente dos diferentes ensaios de produção, foram centrifugadas e uma alíquota de 100 µL do sobrenadante livre de células foi adicionado em cada poço. As placas foram então mantidas por 16 horas à temperatura refrigeração para permitir a difusão dos metabólitos e, posteriormente, incubadas à temperatura de 28 e 37 °C por 24-48h para posterior leitura dos halos de inibição. A atividade antimicrobiana das diferentes culturas e contra cada microrganismo-teste foi determinada em três repetições.

## 2.3 CURVA DE PRODUÇÃO DE METABOLITOS BIOATIVOS

De acordo com os resultados obtidos no experimento anterior, foi realizado um novo ensaio empregando as melhores condições de cultivo e produção de metabólitos. O ensaio foi realizado durante o período de 168 horas, sob agitação constante de 150 r.p.m. e em cultivo estático. A atividade antimicrobiana, o pH e a biomassa foram avaliados a cada 24 horas. Para estes ensaios foram utilizados 17 microrganismos-alvo (Tabela 1).

### 2.3.1 Extração e avaliação da atividade antimicrobiana

As amostras coletadas dos diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96, 120, 148 horas) foram filtradas em membrana com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . Uma alíquota foi reservada para o ensaio de atividade antimicrobiana e os 30 mL restantes foram misturados com 15 mL de acetato de etila e agitado por 30 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes. A fração orgânica foi submetida ao rotavapor para remover o solvente e a fração aquosa foi liofilizada, sendo o material obtido ressuspensão em acetato de etila e tampão fosfato. O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado com a fração bruta, aquosa e orgânica contra oito microrganismos-alvo.

#### 2.3.1.1 Método de microdiluição

O extrato obtido a partir do cultivo em meio ISP2 e a temperatura de 28 °C foi empregado para determinar a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Foram empregados os microrganismos *S. pyogenes*, *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), *S. enterica subsp. enterica* Enteritidis, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

A amostra (50 mg/mL) obtida a partir da extração com acetato de etila (fração aquosa e orgânica) foi diluída em TSB, na proporção de 1:2 até a diluição 0,19 mg/mL. Um volume de 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi adicionado nos poços de microplacas com 96 poços, sendo também adicionada uma suspensão da cultura do microrganismo-alvo (concentração final de  $10^5$  UFC/mL). As placas foram incubadas a 28 e 37 °C por 18-24 horas. Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  foi retirada de cada poço e semeada em placas de TSA para verificar a viabilidade dos microrganismos-teste.

#### 2.3.2 Efeito da temperatura sobre a atividade antimicrobiana

O efeito da temperatura sob a estabilidade dos compostos foi avaliado com as amostras provenientes na condição que se obteve a melhor atividade antimicrobiana (48 e 96 horas de crescimento em meio ISP à temperatura de 28 °C). Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante livre de células foi incubada à temperatura de 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C durante 60 minutos e também submetidos à autoclavação. Após, foi determinada a atividade antimicrobiana residual contra *S. aureus*, pela técnica da difusão em poço.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados dos microrganismos-teste e do isolado *Streptomyces* sp. linhagem 1S estão apresentados na Tabela 2. O isolado *Streptomyces* mostrou resistência à ampicilina, penicilina, cefoxitina, trimetoprim, e eritromicina. Das bactérias Gram-positivas empregadas neste estudo, MRSA e *E. faecium* foram resistentes a 5 e 4 antimicrobianos, respectivamente.

Tabela 2 – Perfil de suscetibilidade de bactérias-teste frente a 12 antimicrobianos determinado pelo método de difusão em disco

Microrganismo	A	AM	CF	TRI	CLO	ERI	GEN	NOR	PEN	POL	TET	VAN
<i>Streptomyces</i>	S	R	R	R	S	R	S	S	R	-	S	S
<i>Bacillus subtilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S
<i>Enterococcus faecium</i>	R	S	R	S	S	I	R	I	S	-	R	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S
<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	R	S	R	R	I	I	R	S	S	-	S	R
<i>Streptococcus pyogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	I	R	S	S	S	R	I	S	R	S	S	R
<i>Pectobacterium brasiliensis</i>	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	R	I	I	S	S	I	S	S	R
<i>Ralstonia solanacearum</i>	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R
<i>Salmonella sp. 86E</i>	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S		R
<i>Salmonella choleraesuis</i>	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: A – amicacina; AM – ampicilina; CF – cefoxitina; TRI – Trimetropim; CL – cloranfenicol; ERI –eritromicina; GEN – gentamicina; NOR – norfloxacina; PEN – penicilina, TET – tetraciclina; VAN – vancomicina. Perfil de Resistência; R – resistente, I – intermediária, S – sensível.

Fonte: os autores.

Entre as bactérias Gram-negativas foi observada maior resistência em *Salmonella* Enteritidis a qual foi resistente a 7 dos 12 antimicrobianos empregados neste estudo e *Ralstonia solanacearum* a 6 antibióticos, incluindo vancomicina. Dos antimicrobianos avaliados, a eritromicina e a vancomicina inibiram 38,47% das bactérias, o antibiótico penicilina inibiu cerca de 46% dos microrganismos. Polimixina B, cloranfenicol e norfloxacina foram os mais efetivos, inibiram 100, 92 e 92% dos isolados, respectivamente.

Dos meios de cultura empregados neste estudo, ISP2 se mostrou o mais efetivo para o crescimento e a síntese de compostos com atividade antimicrobiana. Nesta condição, foi observada a inibição de 6, dos 9 microrganismos-teste empregados (Tabela 3). Nos extratos provenientes do cultivo nos meios TSB, CPD e CN não foi observado inibição de crescimento dos microrganismos-teste.

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. 1S crescido em diferentes meios de cultivo a temperatura de 28 °C durante 48 horas. Média, três repetições, do diâmetro do halo de inibição (mm) dos microrganismos alvo

	Meio AC	Meio B	Meio ISP2	Meio S
<i>Bacillus subtilis</i>	11	0	22	11
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	14	14	26	15
<i>Streptococcus pyogenes</i>	13	15	25	20
<i>Escherichia coli</i>	0	0	16	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	13	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	14	0

Legenda: AC – meio caldo amido caseína; B – meio Bennett's; ISP2 – meio extrato de malte e levedura S – meio proposto por Sahin. Fonte: os autores.

Considerando-se as condições de diferentes temperaturas, observou-se que para crescimento a 30 °C os metabólitos produzidos inibiram *S. aureus*, *S. pyogenes* e *B. subtilis*. Os diâmetros dos halos de inibição variaram de 15 a 22 mm, conforme o tempo de crescimento, microrganismo-teste e meio de cultura. A inibição de *E. coli* foi verificada após 72 horas de cultivo. Diferentes trabalhos têm reportado à resistência de bactérias Gram-negativas aos produtos bioativos, especialmente *E. coli*, cuja inibição, quando ocorre, é mais tardiamente se comparada à inibição de bactérias Gram-positivas (FGUIRA et al., 2005; CHAROENSOHARAT et al., 2008). Oskay, Tamer e Azeri (2009) detectaram inibição de *E. coli* a partir de 32 horas. Resultados similares foram reportados por Hassan, El-Naggar e Said (2001), que observaram a atividade antimicrobiana de diferentes isolados de *Streptomyces*, contra *E. coli* com 48, 96 e 240 horas de cultivo. Estes resultados apresentam diferenças conforme isolado e meio de cultivo.

Nos ensaios realizados às temperaturas de 35 e 40 °C foi observada atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *S. pyogenes*, somente em 3 dos 7 meios testados (ISP2, AC e S), com halos de inibição de 12 a 13 mm de diâmetro.

Os resultados obtidos com o isolado 1S crescido no meio de cultura ISP2 a uma temperatura de 28 °C mostraram os melhores resultados de inibição do crescimento dos microrganismos-alvo. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos com o crescimento do isolado nestas condições por um período de incubação de 168 horas. O isolado 1S inibiu 15 dos 17 microrganismos, exceto os fungos filamentosos *P. thomii* e *T. mentagrophyte*.

Tabela 4 – Atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. 1S crescido em meio ISP2 a temperatura de 28 °C durante 168 horas. Média do diâmetro do halo de inibição (em mm) dos microrganismos-alvo empregando o sobrenadante (continua)

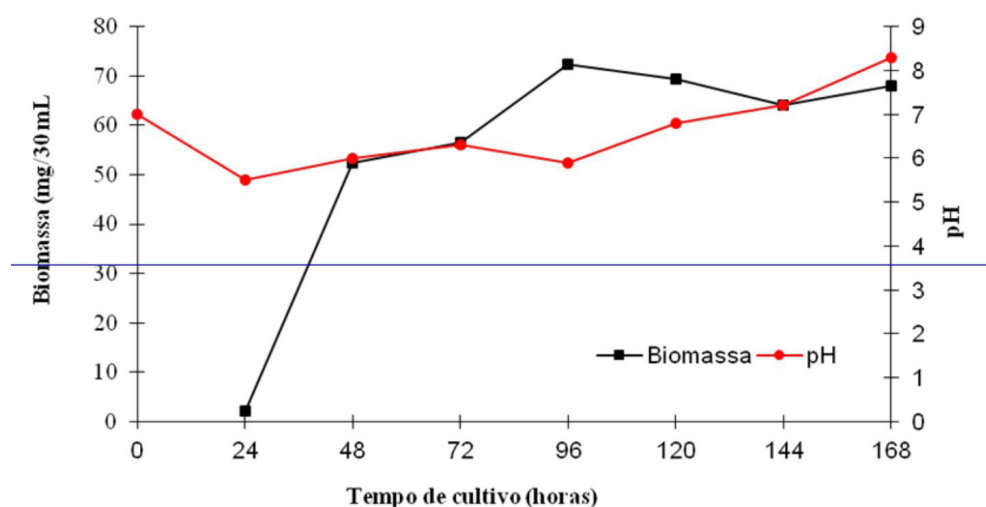
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
<i>B. subtilis</i>	0	18	20	18	18	16	16	15
<i>E. faecium</i>	0	0	0	0	17	16	15	13
<i>S. aureus</i>	11	24	26	25	22	23	20	18
MRSA	0	0	0	0	18	16	11	0
<i>S. pyogenes</i>	10	25	24	24	19	20	20	18

	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
<i>E. coli</i>	0	13	15	12	12	13	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	12	12	12	15	-	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	0	14	17	15	14	12	0	0
<i>S. choleraesuis</i>	0	11	15	15	12	11	0	0
<i>R. solanacearum</i>	0	0	13	12	12		0	0
<i>X. axonopodis citri</i>	0	11	16	14	13	12	0	0
<i>P. brasiliensis</i>	0	12	13	12	11	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	16	16	14	14	13	12	12
<i>C. albicans</i>	0	0	13	15	16	11	0	0
<i>F. oxysporum</i>	0	0	15	15	15	15	0	0

Fonte: os autores.

De maneira geral, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram inibidas com o sobrenadante resultante do cultivo de 24 horas. A inibição de *Ralstonia*, *C. albicans* e *F. oxysporum* somente foi observada nas 48 horas de crescimento, enquanto que *E. faecium* e *S. aureus* (MRSA) foram inibidos mais tardiamente, a partir das 96 horas de cultivo. A atividade antagonista a bactérias Gram-positivas foi observada a partir de 24 horas e permaneceu até 168 horas, já a inibição de fungos e das bactérias Gram-negativas foi detectada no período entre 48 e 120 horas de crescimento. Os melhores resultados de atividade antimicrobiana foram obtidos com os extratos de 48 e 96 horas, o que coincide também com os picos de biomassa celular seca (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Evolução da biomassa microbiana e do pH durante crescimento de *Streptomyces* sp 1S em meio ISP2, à temperatura de 28 °C durante 168 horas de crescimento, sob agitação constante



Avaliando os resultados obtidos nestes experimentos, verificamos que à medida que ocorreu um aumento na temperatura de incubação, foi observada uma redução no diâmetro dos halos de inibição e/



ou ausência destes. Este comportamento se permite inferir que a temperatura é um dos fatores limitantes para a produção dos compostos com atividade antimicrobiana. Resultados similares foram observados por Hassan, El-Naggar e Said (2001) (2001) os quais, nos ensaios com temperaturas superiores a 35 °C, tiveram um efeito adverso sobre o crescimento e a produção de antibiótico por *S. violatus*.

Dos meios de cultura empregados, minerais e orgânicos, o meio ISP2 se mostrou mais efetivo para induzir a produção de metabólitos bioativos nas condições testadas. Diferentemente, Sahla e Al-Zahrani (2007) verificaram que o meio ISP2, foi o que menos induziu a produção de metabólitos bioativos e ainda que os melhores resultados foram observados em cultivo estático. Nos experimentos realizados com o isolado 1S não foi observada atividade antimicrobiana nos ensaios de cultura estática até o período de 240 horas de cultivo.

No presente trabalho, a temperatura de 28 °C foi a que proporcionou os melhores resultados para a produção de antimicrobianos, considerando o espectro de ação e ao diâmetro dos halos de inibição. A atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* tem sido avaliada em diferentes temperaturas, em sua maioria, à temperatura de 30 °C tem sido reportada como a ótima para a produção de metabólitos; no entanto, esta pode variar de 22 a 37,5 °C conforme microrganismo e meio de cultura empregado (HASSAN, EL-NAGGAR; SAID, 2001; SATHI; RAHMAN; GAFUR, 2001; FGUIRA et al., 2005; EL-NAGGAR, 2006; CHAROENSOHARAT et al., 2008; KOCH; LOFFLER, 2009).

A composição do meio de cultura, por apresentar diferentes fontes de carbono como glicose e extrato de malte, podem ser um dos fatores que resultaram nesse comportamento de maior biomassa e produção de metabólitos bioativos. Arasu et al., (2009) encontraram resultados similares, em que a melhor atividade antimicrobiana foi observada com 96 horas de incubação à temperatura de 28 °C. Narayana e Vijayalakshmi (2008) e Li et al. (2005) verificaram atividade antimicrobiana a partir de 48 e 96 horas, com picos de máxima atividade em 120 e 336, horas respectivamente. Estes resultados refletem a diversidade deste grupo de microrganismos, como a influência de diferentes parâmetros, meio de cultivo, fonte de carbono, nitrogênio e temperatura de crescimento sobre a síntese de metabólitos bioativos.

Para o ensaio de microdiluição foi empregada a fração aquosa, visto que a fração orgânica (extraída com acetato de etila) não apresentou atividade antimicrobiana. Dos cinco microrganismos avaliados, *S. pyogenes* se mostrou o mais sensível, com um valor de MIC de 6,25 mg/mL. *S. aureus* (MRSA), *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* se mostraram mais resistentes aos metabólitos, apresentando um MIC de 25 mg/mL, o que foi confirmado pelo antibiograma e por meio do ensaio de difusão em poço. Um resultado similar foi encontrado por EL-Naggar (2006), em que a concentração inibitória mínima para *E. coli* e *C. albicans* foi de 50 e 25 mg/mL, respectivamente. Neste estudo, foi detectada forte atividade contra MRSA (MIC 25 mg/mL) quando comparado com os resultados encontrados por Higginbotham e Murphy (2010), que descobriram um valor de MIC de 100 mg/mL.

Os metabólitos produzidos pelo isolado 1S mostraram grande estabilidade térmica, mantendo 100% da atividade após incubação, por 60 minutos à temperatura de 80 °C. Quando submetido à temperatura de 90 °C somente 30% de atividade foi detectada e esta cessou após 15 minutos de esterilização. Malik et al. (2008) e Augustine, Bhavsar e Kapadnis (2005) obtiveram resultados similares, em que foi observada perda parcial ou total da atividade antimicrobiana em temperatura superior a 100 °C.

Metabólitos produzidos por membros do gênero *Streptomyces* apresentam um amplo espectro de inibição, especialmente contra bactérias Gram-positivas. Nos últimos anos, diferentes espécies como

*S. qinlingensis*, SK4-6, *S. violaceusniger*, *S. antimycoticus*, *S. neopeptinius* e *S. griseus* têm sido reportadas como potenciais produtores de novos antibióticos e como agentes de biocontrole (HAN et al., 2008; ANITHA; REBEETH, 2009; KOCH; LOFFLER, 2009). Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que o isolado 1S apresentou atividade inibitória contra microrganismos de interesse agrícola e clínico, incluindo microrganismos multirresistentes como *S. aureus* (MRSA), *E. faecium* e *Salmonella Enteritidis*, caracterizando-se como um produtor de compostos bioativos, podendo este ser empregado em estudos futuros visando à caracterização e purificação dos compostos bioativos.

## REFERÊNCIAS

- ALANIS, Alfonso Junior. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic Era? **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 697-705, 2005.
- AL-TAI, A. et al. *Streptomyces malaysiensis* sp. Nov., a new streptomycete species with rugose, ornamented spore. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 1395-1402, 1999.
- ANITHA, A., REBEETH, M. In vitro antifungal activity of *Streptomyces griseus* against phytopathogenic fungi of Tomato field. **Academic Journal of Plant Science**, v. 2, n. 2, 119-123, 2009.
- ARASU, M.V. et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (india). **Journal de Mycologie Médicale**, v. 19, p. 22-28, 2009.
- ASAGBRA, A. E.; SANNI, A. I.; OYEWDE, O. B. Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* using some agricultural wastes as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 107-114, 2005.
- AUGUSTINE, S. K.; BHAVSAR, S. P.; KAPADNIS, B. P. A non-polyen antifungal antibiotic from *Streptomyces aldidoflavus* PV23. **Journal Bioscience**, v. 30, n. 2, p. 201-211, 2005.
- CHAROENSOPHARAT, K. et al. An antibacterial substance produced by *Streptomyces* sp. N 87. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, p. 1362-1368, 2008.
- BERDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiples secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Protein Nucleotide Acids**, v. 100, p. 14555-14561, 2003.
- DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v. 1, p. 259-264, 1998.
- EL-NAGGAR, M. Y. Kosinostatin, a major secondary metabolite isolated from the culture filtrate of *Streptomyces violaceusniger* strain HAL64. **Journal of Microbiology**, Korea, v. 45, n. 3, p. 262-267, 2006.
- EL-TARABITY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Soil Biology Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1505-1520, 2006.

- FGUIRA, L. F. et al. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. **Research Microbiology**, v. 156, p. 341-347, 2005.
- FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Antibiotic for emerging pathogens. **Science**, v. 325, n. 916, p. 1089-1093, 2009.
- GUPTE, M., KULKARNI, P., GANGULI, B. N. Antifungal antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, p. 46-57, 2002.
- HAN, J. H. et al. Description of *Streptomyces neopeptinius* sp. Nov, an actinobacterium with broad spectrum antifungal activities. **The Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 295-299, 2008.
- HASSAN, M. A.; EL-NAGGAR, Y.; SAID, W. Physiological factors affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in bath cultures. **Egyptian Journal of Biology**, v. 3, p. 1-10, 2001.
- HIGGINBOTHAM, S. J.; MURPHY, C. D. Identification and characterization of *Streptomyces* sp isolate exhibiting activity against methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Research**, v. 165, n. 1, p. 82-86, 2010.
- KOCH, E.; LOFFLER, I. Partial characterization of the antimicrobial activity of *Streptomyces antimycoticus* FZB53. **Journal Phytopathology**, v. 157, p. 235-242, 2009.
- LI, W. et al. *Streptomyces scopiformis* sp. nov., a novel streptomycete with fastigiated spore chain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1629-1633, 2002.
- LI, F. et al. Chinikomycins A and B: Isolation, structure, elucidation and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. Isolale M045. **J Nat Orod**, v. 68, p. 349-353, 2005.
- MALIK, H. et al. Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 46, p. 254-257, 2008.
- MICHEL, G. B. et al. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella* update. **Microbes and Infections**, v. 8, p. 1898-1814, 2006.
- INTERNATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference methods for broth microdilution, 2009.
- OSKAY, M.; TAMER, A. U.; AZERI, C. Antibacterial of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. **African Journal of Bacteriology**, v. 3, n. 9, p. 441-446, 2004.
- PANDEY, A.; SHUKLA, A.; MAJUMDAR, S. K. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamycetius* M 27 for the production of an antibacterial antibiotic. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 9, p. 909-910, 2005.
- SAHIN, N.; UGUR, A. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. **Turk Journal Biology**, v. 27, p. 79-84, 2003.

SAJID, I. et al. Antifungal and antibacterial activities of indigenous Streptomyces isolates from saline farmlands: screening, rypotyping and metabolic diversity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 601-610, 2009.

SALAMONI, S. P. et al. Preliminary characterization of some Streptomyces species isolated a composting process and their antimicrobial potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, 1847-1856, 2010.

SALH, H. M.; AL-ZAHRANI, M. A. Studies on the antimicrobial activity of Streptomyces sp. Isolated from Jazan. **JKUS Sci**, v. 19, p. 127-138, 2007.

SATHI, Z. S.; RAHMAN, A. A.; GAFUR, M. A. Identifdication and *in vitro* antimicrobial activity of a compound isolated from Streptomyces species. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 12, p. 1523-1525, 2001.

SHIOMI, K. et al. A new antibiotic, actomicyna A<sub>9</sub>, produced by Streptomyces sp. K01-0031. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 74-78, 2005.

THAKUR, D. et al. Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal Mycologil Médicale**, v. 17, p. 242-249, 2007.

XU, L.H. et al. Streptomyces roseoalbus sp. nov., an actinomycete isolated from soil in Yunnan, China. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 189-194, 2005.

Recebido em 28 de agosto de 2012

Aceito em 28 de outubro de 2012