



ARTIGO

Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp.

Themis Collares Antunes¹, Sabrina Pinto Salamoni², Ana Paula Guedes Frazzon³, José Carlos Germani⁴ e Sueli Teresinha Van Der Sand^{5*}

Recebido: 20 de julho de 2012 Recebido após revisão: 4 de fevereiro de 2013 Aceito: 2 de maio de 2013
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2290>

RESUMO: (Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp.). Os actinomicetos são bactérias caracterizadas por sua habilidade em formar hifas, amplamente distribuídos no ambiente e conhecidos pela diversidade na produção de moléculas biologicamente ativas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade de compostos produzidos por seis isolados de *Streptomyces* contra dezenove cepas de *Enterococcus*. O perfil de susceptibilidade dos *Enterococcus* foi avaliado para onze antibióticos, empregando a técnica de difusão de disco em ágar. A atividade antimicrobiana dos estreptomicetos foi avaliada pela técnica da dupla camada. Os isolados que apresentaram atividade foram cultivados em caldo amido caseína à temperatura de 30 °C por sete dias, em agitação constante. Após crescimento, a cultura foi filtrada para obtenção do extrato bruto. A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada através da técnica de difusão em poço. O isolado que apresentou maior espectro de ação foi selecionado para crescimento em meios de cultura suplementados com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. O pH da cultura e biomassa foram determinados em todos os ensaios. Todos os isolados de *Streptomyces* foram efetivos contra *Enterococcus* no ensaio de dupla camada. No ensaio de difusão em poço, o isolado 8S apresentou maior atividade antibiótica que os demais isolados de *Streptomyces* testados. Ao ser crescido em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, o extrato bruto produzido por este isolado teve melhor ação antibiótica em amido e nitrato de potássio. Não foi observada influência da biomassa ou do pH na produção de moléculas antibióticas.

Palavras-chave: *Streptomyces*, resistência, antimicrobianos, cocos Gram positivos.

ABSTRACT: (Influence of nutritional source in optimum growth and in the production of antibiotics by *Streptomyces* sp strains). The actinomycetes are characterized by their ability to form hyphae, are widely distributed in the environment and well known for the production of biologically active molecules. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of six *Streptomyces* isolates against nineteen *Enterococcus* strains. The susceptibility profiles of *Enterococcus* were evaluated against eleven antibiotics by employing the disk diffusion in agar assay. The antimicrobial activity of the streptomycetes was assessed by means of the double layer method. Isolates which showed activity against the test microorganisms were grown in starch casein broth at 30 °C for seven days, under constant agitation. After growth, the culture was filtered to obtain the crude extract. The antimicrobial activity of the crude extract was evaluated by well diffusion method. The isolate that showed the greatest spectrum of activity was used for growth condition optimization. The isolate was grown in broth medium supplemented with different sources of carbon and nitrogen. The pH of the culture and biomass were determined during all assays period. All *Streptomyces* strains showed activity against all *Enterococcus* in the double layer assay. In the well diffusion assay isolate *Streptomyces* 8S showed the higher antibiotic activity against the test microorganisms. When grown on different carbon and nitrogen sources, the crude extract produced by isolate 8S had better antibiotic activity when grown on starch and potassium nitrate. There was no effect of biomass or the pH in the production of antibiotic molecules.

Key words: *Streptomyces*, resistance, antimicrobials, Gram positive coccus.

INTRODUÇÃO

Os actinomicetos são bem conhecidos pela sua capacidade de produzir antimicrobianos e outros metabólitos secundários importantes tais como antitumorais, anti-inflamatórios (Konishi *et al.* 1991, Saadoun & Gharaibeh 2003), agentes antifúngicos (Thakur *et al.* 2007), agentes anti-helmínticos (Sanglier *et al.* 1993) e herbicidas (Lee

et al. 2003). O gênero *Streptomyces* é representado na natureza por uma grande variedade e número de espécies produtoras da maioria dos antibióticos conhecidos na família Actinomycetaceae (Thakur *et al.* 2009). Os *Streptomyces*, produzem cerca de 75% dos antibióticos de uso na medicina humana e veterinária e 60% dos usados na agricultura (Watwe *et al.* 2001). Os principais tipos de

1. Mestranda do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Professora e Pesquisadora no Núcleo Biotecnológico, Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Campus de Videira, SC, Brasil.

3. Professor Adjunto III, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

4. Professor Associado IV, Departamento de Produção de Matéria Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

5. PhD, Professor Associado IV, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para contato. E-mail:svands@ufrgs.br

antibióticos produzidos por espécies de *Streptomyces* são os aminoglicosídeos, antraciclinas, glicopeptídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, políenios, políeteres, e tetraciclinas. O indiscriminado uso de antimicrobianos na medicina tem contribuído para a emergência cada vez maior de bactérias resistentes aos antimicrobianos (Ferber 2002, Mathew *et al.* 2007).

Enterococcus são conhecidos como importantes microrganismos associados com infecções nosocomiais. A emergência de *Enterococcus* nas infecções nosocomiais tem crescido em paralelo com o acentuado número de cepas resistentes a um grande número de antimicrobianos usados no tratamento de infecções em humanos (Shepard & Gilmore 2002, d'Azevedo *et al.* 2006, Macovei & Zurek 2007).

A habilidade das culturas de *Streptomyces* na produção de antibióticos não é uma propriedade fixa, mas pode ser aumentada ou completamente perdida sobre diferentes condições de nutrição e cultivo (Waksman 1961). Portanto, a constituição do meio de cultura, juntamente com a capacidade metabólica do organismo produtor, afeta a biossíntese do antibiótico (Hassan *et al.* 2001). Fontes nutricionais como carbono, nitrogênio e minerais e fatores ambientais como tempo, temperatura e pH têm uma profunda influência na produção de antibióticos pelos actinomicetos (Narayana & Vijayalaxnm 2008). O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de fontes nutricionais na capacidade de produção de substâncias bioativas produzidas por seis isolados de *Streptomyces* contra isolados de *Enterococcus* de origem clínica e ambiental.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de actinomicetos

Os seis isolados de *Streptomyces* sp. utilizados neste estudo são oriundos de processo de compostagem e pertencem à bacterioteca do laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS. Os microrganismos foram isolados e identificados em nosso laboratório utilizando provas morfológicas, bioquímicas e moleculares. As linhagens foram caracterizadas morfológicamente, seguindo as determinações descritas no *International Streptomyces Project* (ISP) (Shirling & Gottlieb 1966, Williams *et al.* 1983). A morfologia das hifas aéreas e no substrato e a cadeia de esporo foi determinada por análise de microscopia das culturas após 10 dias de crescimento a 30 °C (Williams & Cross 1971). As linhagens cresceram nos meios de cultura ágar extrato de malte e levedura (ISP2) (Shirling & Gottlieb 1966) e ágar amido caseína (ACA) seguindo as direções contidas no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams *et al.* 1983). A determinação da cor do substrato aéreo e do micélio, e a produção de pigmento foi avaliada nos meios ISP2, ágar inorgânico de sal-amido (ISP4) e ágar de glicerol-asparagina (ISP5), respectivamente de acordo com o protocolo

descrito por Shirling & Gottlieb (1966).

Para confirmação da identificação realizada, baseada nas características morfológicas, foram realizadas ampliações da região 16S rDNA, utilizando os oligonucleotídeos descritos por Rintala *et al.* (2001) específico para o gênero *Streptomyces*.

Perfil de susceptibilidade das amostras de Enterococcus

Os isolados de *Enterococcus* oriundos do ambiente pertencem à bacterioteca do laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS. Os isolados oriundos de amostras clínicas foram cedidos pelo Dr. Pedro d'Azevedo (UFCSPA). O perfil de susceptibilidade dos 19 isolados de *Enterococcus* foi determinado através da técnica de difusão de disco em ágar conforme as recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2007). Os antibióticos empregados no antibiograma foram: ampicilina (AMP), cefoxitina (CFO), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), eritromicina (ERI), imipenem (IMP), nitrofurantoína (NIT), norfloxacina (NOR), penicilina (PEN), tetraciclina (TET) e vancomicina (VAN).

Atividade antimicrobiana dos isolados de Streptomyces:

Técnica da dupla camada

A atividade antimicrobiana dos seis isolados de *Streptomyces* sp. foi determinada, inicialmente, através da técnica da dupla camada. Foram empregados neste ensaio as 19 cepas de *Enterococcus*. Os isolados de *Streptomyces* sp. foram inoculados em meio ágar amido caseína (ACA: amido 10 g; caseína, 0,12 g; NaCl, 2,0 g; KNO₃, 2,0g; K₂HPO₄, 2,0 g; MgSO₄, 0,05 g; FeSO₄, 0,01 g, CaCO₃ 0,02 g, ágar bacteriológico 6 g) pelo método da picada. Após 14 dias de crescimento a 30 °C foi vertida sobre os crescimentos na placa de Petri uma suspensão contendo 1 mL (10⁸ células/mL) de uma cultura de *Enterococcus* e 9 mL de ágar Müller-Hilton fundido. As placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas. A partir deste ensaio foi determinada a atividade qualitativa, presença ou ausência de halos, dos isolados de *Streptomyces* sp. contra as cepas de *Enterococcus*.

Cultivo em cultura submersa

Para a produção do extrato de interesse, os isolados foram crescidos em frascos de 250 mL contendo 50 mL caldo amido caseína (AC: amido, 10 g; caseína, 0,12 g; NaCl, 2,0 g; KNO₃, 2,0 g; K₂HPO₄, 2,0 g; MgSO₄, 0,05 g; FeSO₄, 0,01 g, CaCO₃ 0,02 g) sob agitação por 7 dias a 30 °C. O pré-inóculo foi preparado em meio AC num volume de 50 mL, sem controle de pH, para cada isolado de *Streptomyces* sp. O pré-inóculo foi cultivado por 48 horas a 30 °C sob agitação de 100 rpm. Após esse período, 5 mL do cultivo com crescimento celular foi transferido para um novo frasco contendo o mesmo meio de cultura e foram incubadas nas mesmas condições de temperatura e agitação por um período de 7 dias.

As amostras coletadas no final do período foram submetidas ao processo filtração utilizando-se membrana filtrante (0,22 µm) para a obtenção dos extratos brutos livres de células.

Técnica de difusão em poço

O ensaio de difusão em poço consistiu na semeadura utilizando um suábe impregnado de uma cultura *Enterococcus*, na concentração de 10^8 células/mL (0,5 da escala de MacFarland) sobre uma placa contendo ágar Muller Hinton. Após a semeadura, foram realizados poços com o auxílio de cilindros de aproximadamente 9 mm de diâmetro distribuídos equidistantes na placa. Em cada poço, foram aplicados 100 µL do extrato bruto de cada isolado. A placa permaneceu por 16 horas a 4 °C para a difusão do extrato no meio de cultura e posteriormente foi incubado a 37 °C por 48h. A partir desta técnica foi determinada a atividade semi-quantitativa dos extratos através da medição dos halos de inibição formados pelos extratos produzidos pelos isolados perante o microrganismo de interesse. Baseado nos resultados obtidos no ensaio de sobrecamada e no ensaio de poço, escolheu-se o isolado de *Streptomyces* que apresentou maior espectro de atividade em ambos os ensaios.

Crescimento e produção de metabólitos sob diferentes fontes de carbono

O ensaio da produção de metabólitos do isolado de interesse sob diferentes fontes de carbono foi realizado contra os *Enterococcus* que apresentaram o maior perfil de resistência no antibiograma. Para avaliar o efeito da fonte de carbono na produção de antibiótico e na biomassa, diferentes fontes de carbono foram testadas: amido, sacarose, glicerol e glicose, que foram adicionados individualmente ao meio basal contendo caseína, 0,3 g; NaCl, 2,0 g; K_2HPO_4 , 2,0 g; $MgSO_4$, 0,05 g; $FeSO_4$, 0,01 g, $CaCO_3$ 0,02 g. As fontes de carbono foram adicionadas na concentração de 1% no meio basal suplementado com KNO_3 , 2,0 g; como fonte de nitrogênio. O isolado selecionado foi inoculado em frascos de 250 mL contendo 50 mL do meio basal acrescido de cada fonte de carbono e incubados a 30 °C por 48h. Destes pré-inóculos, foram retirados 5 mL da cultura e inoculados em novos meios de cultura acrescidos com suas respectivas fontes de carbono. Para os ensaios com cada fonte de carbono, cinco frascos foram inoculados com o isolado de actinomiceto. Os ensaios para determinar a produção de antimicrobiano foram realizados a cada 24h por 5 dias. As amostras foram filtradas através do uso de membrana filtrante (0,22 µm) para obtenção do extrato livre de células. Após a filtração, a membrana de cada amostra foi acondicionada em estufa de 37 °C para pesagem e posterior determinação do peso seco. Também foi determinada o pH de cada amostra por tempo de crescimento. Para determinar a atividade antimicrobiana, alíquotas foram retiradas no tempo zero (inoculação - PI), intervalos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. A atividade dos extratos pro-

duzidos com relação ao tempo de crescimento do isolado de *Streptomyces* foi determinada utilizando a técnica de difusão em poço. Aquela fonte de carbono que proporcionou um extrato com melhor atividade antimicrobiana em um menor tempo contra os *Enterococcus* foi utilizada para o crescimento do isolado testando diferentes fontes de nitrogênio.

Crescimento e produção de metabólitos sob diferentes fontes de nitrogênio

O impacto de diferentes fontes de nitrogênio sob a produção e o crescimento do isolado de interesse foi testado adicionando como fonte de nitrogênio, sulfato de amônia, peptona e extrato de levedura na proporção de 0,2% no meio basal contendo a fonte de carbono com melhor resultado do ensaio sob diferentes fontes de carbono. Como controle utilizou-se o meio basal suplementado de 0,2% KNO_3 . Os procedimentos de atividade antimicrobiana foram realizados da mesma forma como descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No perfil de susceptibilidade das cepas de *Enterococcus*, observou-se que todas foram resistentes a pelo menos dois dos antimicrobianos testados (Tab. 1). Nas amostras clínicas, 90% dos isolados foram resistentes à eritromicina, cefoxitina e ciprofloxacina e 80% mostram perfil de resistência à tetraciclina e cloranfenicol. Das amostras ambientais, 90% foram resistentes a cefoxitina e eritromicina (Tab. 1). A habilidade deste grupo em adquirir novos genes de resistência carregados em plasmídeos, transposons e transposons conjugativos é preocupante, especialmente nos casos onde estas resistências também estão associadas com o aumento da patogenicidade do microrganismo (Amyes 2007).

O gênero *Enterococcus* tem surgido como um dos mais importantes patógenos hospitalares no mundo inteiro. A frequência de seu isolamento vem aumentando desde a última década e, paralelamente ao aumento da incidência, tem-se observado uma elevação na frequência de cepas resistentes aos antimicrobianos de uso corrente (Höner *et al.* 2005). De acordo com as pesquisas recentes da *National Nosocomial Infections Surveillance*, os *Enterococcus* permanecem na terceira posição como o patógeno mais comum causador de infecções nosocomiais (Fraser *et al.* 2010). Os *Enterococcus*, além de apresentarem resistência aos β-lactâmicos e aos glicopeptídeos, também apresentam elevada resistência a outros antimicrobianos, como o cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina e rifampicina, com variações que irão depender do local de origem da amostra e das características desses locais (Tavares 2000).

No ensaio de dupla camada os seis isolados de *Streptomyces* utilizados foram efetivos contra os *Enterococcus* de origem ambiental (Tab. 2). Das amostras clínicas, o isolado 155 não foi inibido por nenhum isolado de *Streptomyces* (Tab. 2). Cabe salientar que a cepa 155 foi resistente à maioria dos antimicrobianos testados,

Tabela 1. Perfil fenotípico de resistência (R, resistente; S, sensível) a antimicrobianos dos isolados ambientais e clínicos de *Enterococcus* sp.

<i>Enterococcus</i>	CFO	TET	VAN	AMP	IMP	PEN	CLO	CIP	ERI	NOR	NIT
3.2**	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
3.8**	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
3.19**	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
3.20**	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
4.16**	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S
5.4**	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
5.6**	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
5.13**	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
5.16**	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
155*	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
488*	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S
555*	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S
570*	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S
581*	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S
603*	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S
617*	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S
619*	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S
1247*	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S
1300*	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S

* Amostras clínicas. ** Amostras ambientais. Abreviaturas: CFO, Cefoxitina; TET, Tetraciclina; VAN, Vancomicina; AMP, Ampicilina; IMP, Imipenem; PEN, Penicilina; CLO, Cloranfenicol; CIP, Ciproxacina; ERI, Eritromicina; NOR, Norfloxacin; NIT, Nitrofurantoína.

exceto ao cloranfenicol. No ensaio de difusão em poço, o extrato produzido pelo isolado *Streptomyces* AP apresentou a menor ação antibiótica (Tab. 3). O extrato bruto produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S mostrou maior atividade antimicrobiana contra os isolados de *Enterococcus* (Tab. 3).

No ensaio utilizando diferentes fontes de carbono, a melhor atividade antimicrobiana com o menor tempo de crescimento foi obtido para o isolado 8S quando crescido na presença de amido como fonte de carbono. Halos de inibição com diâmetros que variaram de 20-25 mm foram observados em 72 horas de crescimento (Tab. 4). A produção de metabólitos com atividade antimicrobiana foi observada partir do tempo zero (P.I) para sacarose e amido. O uso de sacarose apresentou dois picos máximos de atividade, 96 h e 120 h, sendo a maior atividade

antimicrobiana observada às 120h. Os picos de máxima atividade antimicrobiana observados no uso de sacarose como fonte de carbono podem indicar que o isolado ao degradar o dissacarídeo em glicose e frutose pode utilizar os monossacarídeos para produção de compostos secundários com propriedades antimicrobianas. No meio contendo glicerol a produção de metabólitos com ação antimicrobiana foi observada após 48 horas, com atividade máxima em 72 horas (Tab. 4).

No presente estudo, o isolado 8S produziu metabólitos secundários bioativos na presença de amido, sacarose e glicerol como fontes de carbono. No uso de glicose, como fonte de carbono, foi observado crescimento celular, porém a produção de metabólitos bioativos não foi detectável ou estes encontravam-se em baixa concentração. A glicose é uma molécula simples que pode estar

Tabela 2. Perfil da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* sp. contra *Enterococcus* sp. de origem ambiental* e clínica** pela técnica de dupla camada.

<i>Enterococcus</i>	<i>Streptomyces</i>					
	2S	3S	8S	48	50	AP
3.2**	+	+	+	+	+	+
3.8**	+	+	+	+	+	+
3.19**	+	+	+	+	+	+
3.20**	+	+	+	+	+	+
4.16**	+	+	+	+	+	+
5.4**	+	+	+	+	+	+
5.6**	+	+	+	+	+	+
5.13**	+	+	+	+	+	+
5.16**	+	+	+	+	+	-
155*	-	-	-	-	-	-
488*	+	+	+	+	+	+
555*	+	+	+	+	+	+
570*	+	+	+	+	+	+
581*	+	+	+	+	+	+
603*	+	+	+	+	+	+
617*	+	+	+	+	+	+
619*	+	+	+	+	+	-
1247*	+	+	+	+	+	+
1300*	+	+	+	+	+	+

(+) Formação de halo. (-) Ausência de halo.

Tabela 3. Perfil da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* sp. contra *Enterococcus* sp. de origem ambiental* e clínica** pel técnica de difusão em poço.

<i>Enterococcus</i>	<i>Streptomyces</i>						AP
	2S	3S	8S	48	50		
3.2**	17***	23	25	21	21	-	
3.8**	19	23	25	23	25	-	
3.19**	17	22	26	22	25	-	
3.20**	17	22	27	21	25	-	
4.16**	25	23	23	21	17	-	
5.4**	21	25	29	25	25	-	
5.6**	17	21	25	19	21	18	
5.13**	19	23	19	21	24	19	
5.16**	21	21	27	23	25	-	
155*	-	-	-	-	-	-	
488*	18	25	29	28	27	-	
555*	21	25	37	25	37	25	
570*	13	25	29	29	23	-	
581*	21	21	29	29	37	-	
603*	25	25	37	29	14	21	
617*	25	25	37	29	33	33	
619*	25	25	37	29	41	17	
1247*	-	24	37	26	33	21	
1300*	-	-	29	25	33	-	

*** Diâmetro da zona de inibição (mm).

sendo metabolizada mais rapidamente e contribuindo apenas para síntese de material celular. Dessa forma, uma pequena quantidade de carbono e energia fica disponível para a produção de antibióticos. A produção de metabólitos secundários é frequentemente afetada de forma negativa devido à fonte de carbono. Esse fenômeno regulatório, chamado de repressão catabólica do carbono, afeta a produção de metabólitos secundários (Inoue *et al.* 2007). Repressão catabólica é um fenômeno generalizado na natureza que pode ser definido como a repressão de atividades enzimáticas pela presença de um catabólito no meio de crescimento. Embora este possa ser qualquer catabólico, maior interesse tem sido focado no mecanismo de repressão pela glicose (Kwak-

man *et al.* 1994). Entretanto, a produção desses compostos pode ser negativamente afetada pela concentração do carboidrato, assim como a absorção de outras fontes de carbono rapidamente assimiláveis. A influência negativa da D-glicose vem sendo bem documentada na produção de diversos antibióticos (Kwakman *et al.* 1994, Kim *et al.* 2001). Contudo, exceto para alguns exemplos como a biossíntese de eritromicina por *Sacharopolyspora erythrae* ou formação de actinomicina D em *Streptomyces antibioticus*, a base bioquímica e molecular dessa repressão não foi claramente estabelecida e o processo regulador envolvido permanece sem elucidação (Escalante *et al.* 1999).

Relacionando o uso da sacarose e da glicose como

Tabela 4. Perfil de atividade antimicrobiana do isolado 8S contra isolados de *Enterococcus* sp. clínicos*, ambientais** e *E. faecium* ATCC, crescendo em diferentes fontes de carbono: glicose (GLI), glicerol (GLCL), amido (AM) e sacarose (SA).

<i>Enterococcus</i>	PI				24h				48h			
	GLI	GLCL	AM	SA	GLI	GLCL	AM	SA	GLI	GLCL	AM	AS
155*	0***	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.16**	0	0	18	24	0	0	12	18	0	0	20	0
5.4**	0	21	20	22	0	0	15	20	0	0	24	17
5.6**	0	22	25	25	0	0	0	21	0	0	25	15
5.16**	0	20	20	24	0	0	13	19	0	0	21	16
581*	0	20	20	23	0	13	13	17	0	0	23	21
619*	0	19	20	25	0	14	15	20	0	0	24	21
1300*	0	0	19	21	0	0	13	22	0	0	0	20
<i>E. faecium</i>	0	20	20	25	0	0	15	20	0	0	12	20

<i>Enterococcus</i>	72h				96h				120h			
	GLI	GLCL	AM	SA	GLI	GLCL	AM	SA	GLI	GLCL	AM	SA
155*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.16**	0	15	24	18	0	22	22	20	0	26	12	25
5.4*	0	11	20	20	0	21	22	21	0	28	25	26
5.6*	0	11	25	24	0	14	21	22	0	25	24	22
5.16*	0	10	25	19	0	22	21	20	0	26	23	27
581**	0	12	22	20	0	18	24	20	0	27	23	25
619**	0	12	22	20	0	20	22	22	0	28	11	20
1300*	0	15	20	18	0	17	18	19	0	22	26	27
<i>E. faecium</i>	0	18	23	15	0	23	22	24	0	24	25	26

*** Diâmetro da zona de inibição (mm). PI, Tempo zero.

Tabela 5. Perfil de atividade antimicrobiana do isolado 8S contra *Enterococcus* sp. clínicos*, ambientais** e *E.faecium* ATCC, crescido nas fontes de nitrogênio: sulfato de amônia (AS), peptona (PEP), extrato de levedura (EL) e nitrato de potássio (KNO₃).

<i>Enterococcus</i>	PI				24h				48h			
	AS	PEP	EL	KNO ₃	AS	PEP	EL	KNO ₃	AS	PEP	EL	KNO ₃
155*	0***	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.16**	15	15	0	17	0	0	0	9	0	0	0	18
5.4**	10	15	0	20	0	0	0	14	0	0	0	21
5.6**	13	13	0	22	0	0	0	0	0	0	0	25
5.16**	13	13	0	19	0	0	0	13	0	0	0	19
581*	15	13	0	19	0	0	0	11	0	0	0	21
619*	16	13	0	18	0	0	0	13	0	0	0	20
1300*	13	15	0	19	0	0	0	13	0	0	0	0
<i>E.faecium</i>	16	15	0	18	0	0	0	14	0	0	0	11

<i>Enterococcus</i>	72h				96h				120h			
	AS	PEP	EL	KNO ₃	AS	PEP	EL	KNO ₃	AS	PEP	EL	KNO ₃
155*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.16**	0	10	14	10	0	16	0	20	0	18	17	15
5.4**	0	15	12	17	0	19	0	18	0	20	19	16
5.6**	12	22	16	25	0	22	0	22	16	27	22	23
5.16**	0	13	0	12	0	16	0	18	0	17	16	15
581*	11	16	11	20	0	18	0	21	14	20	19	17
619*	0	17	0	18	0	19	0	21	17	20	20	18
1300*	0	18	12	18	0	20	0	21	11	20	20	15
<i>E.faecium</i>	11	18	16	20	0	20	0	21	11	18	20	13

*** Diâmetro de zona de inibição em milímetros. P.I., Tempo zero.

fontes de carbono, podemos inferir que a hidrólise da molécula de sacarose em duas fontes de açúcar permite que o organismo tenha um saldo energético para a produção de metabólitos secundários, utilizando os compostos tanto para síntese de material celular quanto para a produção de compostos bioativos. Além disso, o crescimento do microrganismo não está diretamente relacionado com a produção de extratos antimicrobianos; um organismo pode crescer sem produzir metabólitos com esta função, ou seja, mesmo que o meio promova o crescimento do isolado, a produção de moléculas bioativas pode ser baixa. Thakur *et al.* (2009), ao testarem a influência da nutrição na produção de metabólitos antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* sp. 201, verificaram que a capacidade de formação de zonas de inibição não estava correlacionada com o peso seco do micélio.

O isolado 8S quando crescido em amido apresentou um aumento constante da biomassa durante os cinco dias de incubação (Fig. 1). No entanto, as demais

fontes de carbono testadas induziram um aumento da biomassa. Analisando os resultados obtidos (Tab. 4) pode-se inferir que, para as condições testadas, o aumento da biomassa não apresenta uma relação direta com o aumento da produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. Quando comparados os resultados de ação antimicrobiana do isolado 8S crescido em amido e sacarose, observamos que houve uma maior atividade antimicrobiana do isolado 8S, quando crescido em sacarose, nos períodos de 24 horas e 120 horas, onde a biomassa era menor daquela obtida pelo crescimento do isolado em amido. Sarra *et al.* (1993) obtiveram maior peso seco e maior atividade antimicrobiana de *Streptomyces lividans* TK21 quando crescido na presença de amido comparado com o resultado obtido com sacarose. O mesmo fato ocorreu quando Zahrani (2007), que estudou o efeito de diferentes fontes de carbono em *Streptomyces* isolado J12. Sathi *et al.* (2001) apontam a sacarose como melhor fonte de carbono para atividade antimicrobiana.

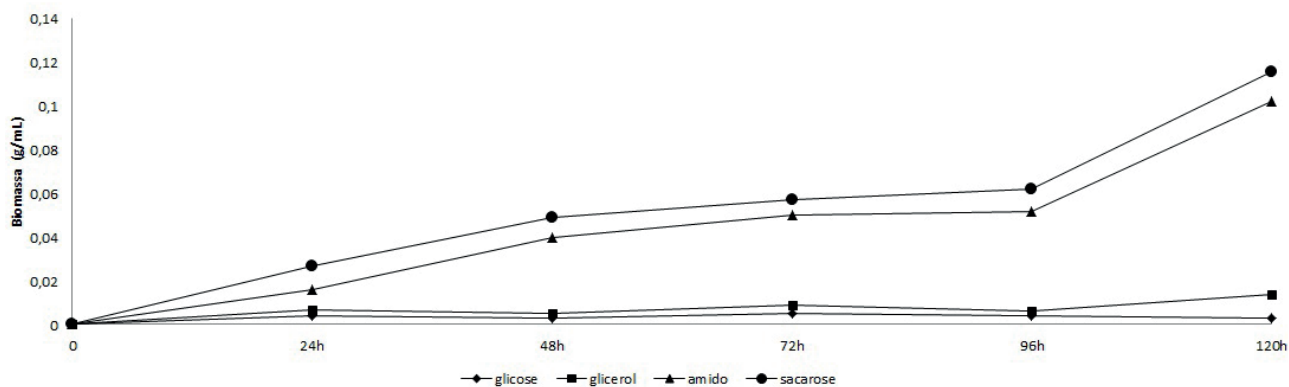


Figura 1. Curvas de crescimento do isolado *Streptomyces* 8S sob diferentes fontes de carbono, a temperatura de 30 °C, por 120 horas e agitação de 100 rpm.

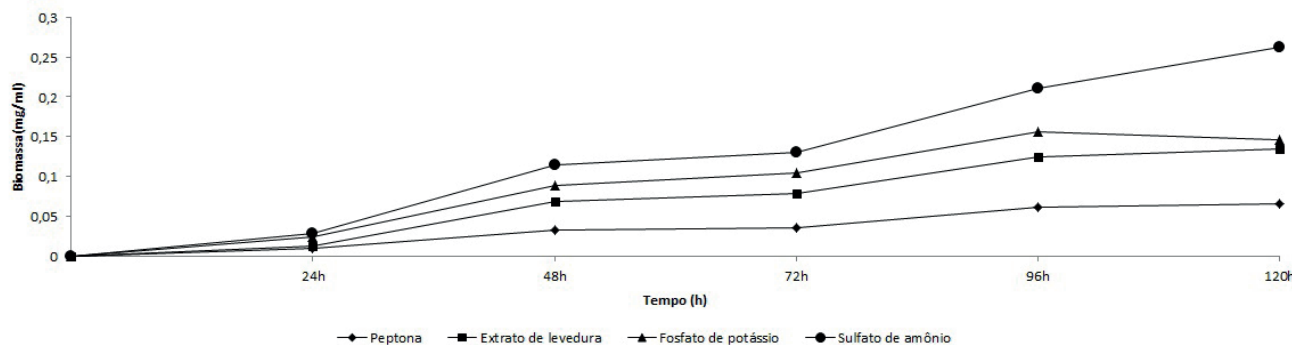


Figura 2. Curvas de crescimento do isolado *Streptomyces* 8S sob diferentes fontes de nitrogênio, a temperatura de 30 °C, por 120 horas e agitação de 100 rpm.

O pH da cultura manteve-se constante quando as fontes de carbono foram sacarose e glicerol (pH 8,0). O isolado crescido em amido após 48 horas manteve o pH em 6,0. Quando crescido com glicose, o pH 7,0 foi mantido com um declínio em 120 horas.

No ensaio onde diferentes fontes de nitrogênio foram testadas, a ação antimicrobiana foi mais eficiente quando o isolado 8S foi crescido em nitrato de potássio (Tab. 5). Thakur *et al.* (2009), ao testarem a influência da suplementação de nitrogênio na produção de metabólitos antimicrobianos por *Streptomyces* sp. 201, detectaram uma maior formação de zona de inibição com o uso de nitrato de potássio e asparagina.

Os extratos brutos resultantes do crescimento do isolado em sulfato de amônia, extrato de levedura e peptona apresentaram atividade somente depois de 72 horas de crescimento. Tanto o extrato produzido com o uso de peptona quanto o produzido com extrato de levedura apresentaram atividade máxima após 120 horas (Tab. 5). Ao testar a influência de fontes de nitrogênio, Al-Zahrani (2007) obteve as maiores atividades antimicrobianas nos meios de culturas contendo nitrato de potássio, extrato de levedura e peptona, respectivamente, e sulfato de amônia apresentou a menor formação de zona de inibição.

O isolado 8S apresentou formação de biomassa total nos meios contendo fontes orgânicas de nitrogênio (peptona e extrato de levedura), onde também foi possível observar a produção de um pigmento de cor marrom. Himabindu & Jetty (2006) demonstraram em estudos com *Micromonospora echinospora* que o meio suplementado com extrato de levedura é favorável ao crescimento físico do microrganismo, mas não é favorável para a produção de antibióticos. Observou-se um aumento da biomassa durante toda a curva de crescimento do isolado em meio de cultura com suprimento de sulfato de amônia, peptona e extrato de levedura, sendo este mais acentuado perante a influência de sulfato de amônio. Para suplementação com nitrato de potássio, pode-se observar um crescimento da biomassa nas primeiras 96 horas, seguida por um leve declínio na produção em sua formação (Fig. 2). O crescimento do isolado 8S no meio de cultura suplementado com nitra-

to de potássio manteve o pH estável em 7,0 até as 96 horas de crescimento e após observou-se um declínio para pH 5,0. Nos meios de cultura contendo peptona e extrato de levedura, o pH dos cultivos permaneceram em torno de 6,0. Em sulfato de amônia, o pH inicial foi 6,0 passando para pH 7,0 após 24 h e decaindo para pH 5,0 após 72 horas.

O decréscimo de pH observado para glicose como fonte de carbono e para sulfato de amônia como fonte de nitrogênio pode influenciar na produção de antibióticos bem como o crescimento das culturas. Vasavada *et al.* (2006) reportaram a influência do pH na produção e no crescimento de *Streptomyces sannanensis* e observaram que essa espécie, assim como outras pertencentes ao gênero, secreta metabólitos antimicrobianos em condições alcalinas e que o crescimento também é influenciado pela taxa de pH. O mesmo efeito foi observado por Sultan *et al.* (2002) ao obter melhores condições de produção *in vitro* de metabólitos ativos de *Streptomyces* em pH 8 e diminuição de produção com a acidificação do pH. No presente estudo, observou-se que o isolado 8S foi capaz de produzir moléculas bioativas na presença de diversas fontes de carbono e nitrogênio bem como diferentes condições de crescimento, sob influência de variação de pH, temperatura e tempo de incubação. A melhor atividade foi obtida para o isolado *Streptomyces* 8S quando crescido em meio de cultura suplementado com amido como fonte de carbono, nitrato potássio como fonte de nitrogênio e pH 6,0. A atividade inibitória contra as amostras clínicas e ambientais de *Enterococcus* resistentes a antimicrobianos de uso constante na prática clínica caracteriza este isolado como um microrganismo com uma grande potencial biotecnológico, pois este composto bioativo, de interesse, pode ser empregado em estudos futuros visando à purificação deste produto para conhecimento da molécula química e estudo da viabilidade e produção do mesmo em biorreator.

CONCLUSÕES

Todos os isolados de *Streptomyces* apresentaram atividade contra *Enterococcus*. O isolado 8S mostrou um maior espectro de atividade antimicrobiana quando cres-

cido em amido e nitrato de potássio. O pH não apresentou grandes variações frente às diferentes fontes nutricionais de carbono e nitrogênio. A produção de antibióticos é influenciada pelo tipo e qualidade dos elementos nutricionais e fatores ambientais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro na forma de verba para realizar os experimentos e pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- AL-ZAHRANI, S.H.M. 2007. Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from Japan. *Journal of King Abdulaziz University*, 19: 127-138.
- AMYES, G.B. 2007. Enterococci and streptococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29: S43-S52.
- COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI. 2003. *Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão*: Norma Aprovada – Nona Edição. Documento M2-A9 V.26.
- D'AZEVEDO, P. A., DIAS, C. A. G. & TEIXEIRA, L. M. 2006. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from Southern region of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 48: 11-16.
- ESCALANTE, L., RAMOS, I., IMRISKOVA, I., LANGLEY, E. & SANCHEZ, S. 1999. Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 572-578.
- FERBER, D. 2002. Antibiotic resistance. Livestock feed ban preserves drugs' power. *Science*, 295: 27-28.
- FRASER, S. L., LIM, M., DONSKEY, J.C. & SALATA, R.A. *Enterococcal Infections (Infectious disease)*. *Medscape References: Drugs, Diseases and Procedures*. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/216993-overview>. Acessado em: 18 jul. 2012.
- GOOSSENS H., FERECHE M., VAN DER STICHELE R. & ELSEVIERS M. 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, 365: 579-587.
- INOUE, O.O., NETTO, W.S., PADILHA, G. & FACCIOTTI, M.C. 2007. Carbon catabolite repression of retamycin productions by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Journal of Microbiology* 38: 58-61.
- HASSAN, M. A., EI-NAGGAR, M. Y. & SAID, W. Y. 2001. Physiological factor affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. *Egyptian Journal of Biology*, 3: 1-10.
- HIMABINDU, M. & JETTY, A. 2006. Optimization of nutritional requirements for gentamicin production by *Microspora echinospora*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44: 842-848.
- HÖRNER, R., LISCANO, M.G.H., MARASCHIN, M.M., SALLA, A., MENEGHETTI, B., FORNO, N.L. & RIGHI, R.A. 2005. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 41: 391-395.
- KWAKMAN, J. H. J. M. & POSTMA, P.W. 1994. Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 179(9): 2694-2698.
- KIM, E. S., HONG, H. J., CHOI C. Y. & COHEN, S.N. 2001. Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of afsR2 gene transcription. *Journal of Bacteriology* 183(7): 2198-2203.
- KONISHI, M., OHKUMA, H., MATSUMOTO, K., TSUNO, T., KAMEI, H., MIYAKI, T., OKI, T., KAWAGUCHI, H., VANDUYNE, G. D. & CLARDY, J. 1991. Dynamics new antibiotics with the 1,5 diyn-3-ene and anthraquinone subunit. Production, isolation and physico-chemical properties. *The Journal of Antibiotics*, 44: 1300-1305.
- LEE, H. B., KIM, C. J., KIM, K. S. & CHO, K. Y. 2003. A bleaching herbicidal activity of methoxyhygromycin (MHM) produced by an actinomycete strain *Streptomyces* sp. 8E-12. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 387-391.
- MACOVEI, L. & ZUREK, L. 2007. Influx of enterococci and associated antibiotic resistance and virulence genes from ready-to-eat food to the human digestive tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6740-6747.
- MATHEW, A. G., CISSELL, R. & LIAMTHONG, S. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathogen Disease*, 4: 115-133.
- NARAYANA, K. J. P & VIJAYALAKSHMI, M. 2008. Optimization of antimicrobial metabolites production by *Streptomyces albidoflavus*. *Research Journal of Pharmacology*, 2: 4-7.
- RINTALA, H., NEVALAINEN, A., RÖNKÄ, E. & SUUTARI, M. 2001. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of Streptomycetes. *Molecular and Cellular Probes*, 15: 337-347.
- SAADOUN, I & GHARAIBEH, R 2003. The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *Journal Arid Environments*, 53: 365-371.
- SANGLIER, J. J, HAAG, H., HUCK, T. A. & FEHR, T. 1993. Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Research in Microbiology*, 144: 633-642.
- SARRA, M., IÑAKI, R., FRANÇOIS, O., FRANCESC, G. & CARLES, C. 1993. Application of factorial design to the optimization of medium composition in batch cultures of *Streptomyces lividans* TK21 producing a hybrid antibiotic. *Biotechnology Letters*, 15(6): 559-564.
- SATHI, Z. S., RAHMAN, A. A., & GAFUR, M. A. 2001. Identification and in vitro antimicrobial activity of a compound isolated from *Streptomyces* species. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(12): 1523-1525.
- SHEPARD, B. D. & GILMORE, M. S. 2002. Antibiotic-resistant enterococci the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infection*, 4: 215-224.
- SHIRLING, E. B. & GOTTLIEG, D. 1966. Characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 7: 313-340.
- SULTAN, M. Z., KHATUNE, N. A., SHATI, S. Z., BHUIYAN, M. S. A., SADIK, M. G., CHOUDURY, M. A., GAFUR, M. A. & RAHMAN, A. A. 2002. In vitro antibacterial activity of a active metabolite isolated from *Streptomyces* species. *Biotechnology Asian Network for Scientific Information*, 1(2-4): 100-106.
- TAVARES, W. 2000. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(3): 281-301.
- THAKUR, D., YADAV, A., GOGOI, B. K. & BORA, T. C. 2007. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *Journal de Mycologie Médicale*, 17: 242-249.
- THAKUR, D., BORA, T.C., BORDOLOI, G. N. & MAZUMDAR, S. 2009. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *Journal de Mycologie Médicale*, 19: 161-167.
- VASAVADA, S.H., THUMAR J. T. & SINGH S. P. 2006. Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Current Science*, 91: 1393-1397.
- WAKSMAN, S.A. 1961. *The actinomycetes. Classification, identification and description of genera and species*. Vol 2. Baltimore: The Williams and Wilkins Co. 363 p.
- WATVE, M.G., TICKOO, R., JOG, M. M. & BHOLE, B.D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Archives of Microbiology*, 176: 386-390.
- WILLIAMS, S.T. & CROSS, T. 1971. Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. *Methods Microbiology*, 4: 295-333.
- WILLIAMS, S.T., GOODFELLOW, M., ALDERSON, G., WELLINGTON, E.M.H., SNEATH, P.H.A. & SACKIN, M.J. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal Genetic Microbiology*, 129: 1743-1813.