

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Marcela Proença Borba

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE CRESCIMENTO PARA *Streptomyces* sp. –
visando o potencial antimicrobiano

Porto Alegre, 2013

Marcela Proença Borba

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE CRESCIMENTO PARA *Streptomyces* sp. –
visando o potencial antimicrobiano

Trabalho de Conclusão de Curso na forma de
artigo científico a ser submetido à revista
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz como
requisito para obtenção de Grau de
Bacharel em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora: Profa. Dr. Sueli T. Van Der Sand

Porto Alegre

2013

Apresentação

Optou-se por apresentar este trabalho em forma de artigo científico, conforme possibilitado pela Decisão 01/2010 da Comissão de Graduação em Ciências Biológicas (<http://www.ufrgs.br/comgradbio/index.php>). O presente trabalho será submetido à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz e obedece aos padrões de apresentação exigidos pela mesma, devidamente anexados ao final do artigo. No entanto, decidiu-se por apresentar as figuras e tabelas no decorrer do texto devido à praticidade de leitura e correção pelos membros da Banca Examinadora. Assim como a numeração das páginas.

Streptomyces e o potencial antimicrobiano

Avaliação das Condições Ideais de Crescimento para *Streptomyces* sp. – visando o potencial antimicrobiano

Marcela Proença Borba, Sueli Teresinha Van Der Sand

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.
ceh.proenca@gmail.com / svands@ufrgs.br

Sumário

O presente trabalho avalia a atividade antimicrobiana de um isolado de *Streptomyces* 8S contra cepas de *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. de origem clínica multirresistentes a antimicrobianos, visando a obtenção de condições otimizadas para a maior produção do composto antimicrobiano presente no isolado. Os ensaios de otimização da produção do composto foram realizados em cultura submersa, buscando a produção do extrato bruto e alternando diferentes fontes de carbono (sacarose ou amido), temperatura (30°C a 55°C, variando 5°C) e pH (5,0 a 10,0) do meio de cultivo. A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada através da técnica de difusão em poço. O isolado 8S apresentou maior atividade antimicrobiana frente as bactérias teste quando crescido com sacarose com fonte de carbono a uma

temperatura de 30°C. No que se refere ao pH do meio de cultivo, observou-se que quando ocorreu o tamponamento para manutenção do pH determinado, o isolado apresentou maior atividade em pH 8,0. Sem a utilização de tampões no meio de cultivo, nenhum resultado foi superior àquele obtido com o tamponamento. Os resultados obtidos sugerem a produção de um composto com uma ótima atividade contra bactérias Gram-positivas multirresistentes e de grande importância nas infecções nosocomiais.

Palavras – chave

Agentes Anti-Bacterianos. *Streptomyces*. Resistência Antimicrobiana.

Patrocínio

Bolsa FAPERGS; fomento CAPES/PROAP

Introdução

Streptomyces é um importante gênero bacteriano pertencente ao grupo dos actinomicetos (Waskman & Henrici 1943). Os actinomicetos formam um clado extenso e diversificado de bactérias Gram-positivas que desempenham um importante papel como produtores de substâncias biologicamente ativas, como resultado da produção de metabólitos secundários (Bérdy 2005). Estes micro-organismos representam uma das maiores comunidades microbianas do solo e a sua ocorrência é bastante influenciada por condições ambientais como umidade, temperatura e pH (Basilio et al. 2003). Os estreptomicetos, por sua vez, são produtores de cerca de dois terços dos

antibióticos conhecidos disponíveis no mercado (Bérdy 2005). Os estreptomicetos continuam sendo a maior fonte de substâncias bioativas, pois um grande número de novos compostos ainda está por ser descoberto (Kurtboke 2012). As condições de cultivo desse micro-organismo são fatores determinantes para a produção *in vitro* da substância biologicamente ativa (Hassan et al. 2001), sendo que os aspectos fisiológicos são fundamentais na prospecção de moléculas antibióticas.

Doenças infecciosas ainda pontuam como a segunda causa mundial de morte (Yoneyama & Katsumata 2006). Visando a prevenção destas, muitos esforços ainda são necessários para o desenvolvimento de novas drogas antibacterianas, antes do aparecimento e disseminação de novos casos de resistência. A seleção, nos diferentes ambientes, de bactérias resistentes vem contribuindo para o aumento do pool de genes de resistência, devido principalmente ao indiscriminado uso de antibióticos (Alvan et al. 2011). As consequências desse processo estão sendo cada vez mais evidentes e o processo de descoberta de novas drogas é lento, possui uma baixa taxa de aproveitamento, além do elevado custo. Estas moléculas não podem ser tóxicas ao ser humano, mas devem ser absorvidas para que o efeito desejado aconteça e também devem ser eliminadas do organismo (Tang et al. 2012).

Staphylococcus aureus, apesar de ser naturalmente suscetível a praticamente todos os antibióticos já desenvolvidos (Chambers & DeLeo 2009), tornou-se mundialmente conhecido por causar transtornos em hospitais ao adquirir resistência a meticilina (Neu 1992). Hoje no Brasil, cerca de 50% das infecções hospitalares ocorrem devido ao grupo dos estafilococos (ANVISA 2009). A infecção por *Staphylococcus epidermidis* tornou-se um problema devido a utilização de dispositivos médicos, tais

como cateteres e válvulas cardíacas, pelo aumento da chance de contaminação do instrumento através da inoculação desse micro-organismo, presente normalmente na pele humana, levando a infecção para dentro do corpo do paciente (Otto 2009).

Os *Enterococcus* sp. são naturalmente resistente a vários antibióticos de uso rotineiro na medicina. Estes micro-organismos possuem alta capacidade de adquirir resistência à vancomicina, sendo então agentes de disseminação de genes de resistência (Arias & Murray 2012). *Enterococcus* é hoje um gênero importante nas infecções nosocomiais e as duas espécies mais comumente encontradas em amostras clínicas são *E. faecalis* e *E. faecium* (Panesso et al. 2010).

Considerando o exposto acima, o presente estudo teve como objetivos avaliar e otimizar a produção do composto antimicrobiano do isolado *Streptomyces* 8S, ativo contra cepas de *Staphylococcus* e *Enterococcus* multirresistentes a antibióticos.

Materiais e Métodos

1. *Streptomyces* 8S

O isolado utilizado no presente estudo, *Streptomyces* 8S, é oriundo de processos de compostagem e pertencente à bacterioteca do laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS. O isolado 8S foi identificado em nível de gênero, juntamente com outros isolados, utilizando provas morfológicas, bioquímicas e moleculares (Oliveira 2003). Posteriormente, seu potencial antimicrobiano foi testado contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras (Salamoni et al 2010, Antunes 2013).

2. Bactérias-teste

Foram selecionadas bactérias Gram-positivas dos gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* multirresistentes a uma série de antibióticos (Antunes 2013). As amostras foram cedidas pelo Professor Dr. Pedro d’Azevedo da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e pela Dr. Ana Lucia Antunes da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Os micro-organismos são oriundos de amostras clínicas, sendo eles cinco *S. aureus*, três *S. epidermidis*, onze *E. faecalis* e dois *E. faecium*.

3. Seleção das amostras teste

Dentre as vinte e uma amostras clínicas cedidas para execução deste trabalho, foram selecionadas aquelas que apresentaram melhor perfil de inibição quando exposto ao extrato bruto produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S. O ensaio foi realizado utilizando o método de difusão em poço como descrito no item 5.

4. Cultivo em cultura submersa

Para a produção do extrato bruto, o isolado *Streptomyces* 8S foi cultivado em frascos de 250 mL contendo 50 mL de caldo amido caseína (amido 10,0 g; caseína 0,3 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). O pré-inóculo foi cultivado por 72 h a 30°C sob agitação de 100 rpm. Após esse período, 5 mL do cultivo com crescimento celular foram transferidos para um novo frasco contendo o mesmo meio de cultura e este, então, incubado nas mesmas condições de

temperatura e agitação por um período de 7 dias. Após o período determinado de crescimento, o caldo com crescimento celular era centrifugado, em microcentrífuga, em alíquotas de 2 mL, por vinte minutos e 13000 rpm. O precipitado era então desprezado e o sobrenadante, extrato bruto, era armazenado em -18°C.

5. Método de difusão em poço

O ensaio de difusão em poço consistiu na semeadura utilizando um suabe impregnado de uma cultura de bactéria teste na concentração de 10^8 células/mL (0,5 da escala MacFarland) sobre uma placa contendo agar triptona de soja (TSA). Após a semeadura, foram realizados poços de aproximadamente 7 mm de diâmetro distribuídos equidistantes na placa. Em cada poço, foram aplicados 100 µL do extrato bruto. A placa permaneceu por até 24h a 4°C para a difusão do extrato bruto no meio de cultivo e posteriormente foi incubado a 37°C por 24h. A atividade quantitativa do composto antimicrobiano foi determinada através da medição dos halos de inibição.

6. Crescimento e produção de metabólitos sob diferentes fontes de carbono

Para avaliar o efeito da fonte de carbono na produção de antibióticos pelo isolado *Streptomyces* 8S, amido e sacarose foram adicionados individualmente ao meio basal contendo caseína 0,3 g; NaCl 2,0 g; KNO₃ 2,0 g; K₂HPO₄ 2,0 g; MgSO₄ 0,05g; FeSO₄ 0,01g, CaCO₃ 0,02 g. As fontes de carbono foram adicionadas na concentração de 1%. O isolado *Streptomyces* 8S 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 72h. Do pré-inóculo foram retirados 5mL da cultura e inoculados em um novo frasco contendo

meio de cultivo igual ao respectivo pré-inóculo. Para determinar a atividade antimicrobiana, alíquotas foram retiradas no tempo zero (inoculação), com intervalos de 24h até o término do período de incubação. A atividade dos extratos produzidos com relação ao tempo de crescimento do isolado *Streptomyces* 8S 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 foi utilizada para o crescimento do isolado testando diferentes temperaturas e pH.

7. Avaliação da temperatura

A avaliação das diferentes temperaturas foi realizada utilizando cultura submersa e a fonte de carbono com a qual o isolado *Streptomyces* 8S apresentou melhor atividade antimicrobiana. Utilizando-se o meio de cultivo acima descrito, com a fonte de carbono previamente selecionada, ensaios utilizando diferentes temperaturas de incubação foram realizados. As temperaturas de incubação variaram de 30°C até 55°C, com intervalos de 5°C. O tempo de crescimento foi de 3 dias.

8. Avaliação de pH

Com a fonte de carbono e a temperatura determinadas, o meio de cultivo teve seu pH medido e ajustado para valores de 5,0 a 10,0 com intervalos de 1,0. No primeiro ensaio, o meio de cultivo não sofreu alteração, somente o ajuste do pH inicial. Em outro ensaio, foram utilizadas soluções tampão para manutenção do pH ajustado. Para as faixas de pH de 5,0 a 8,0 foi utilizada a Solução Tampão de McIlvaine

e para as faixas de pH 9,0 e 10,0 foram utilizadas duas soluções, ácido bórico - cloreto de potássio 0,1M e ácido aminoacético 0,1M.

Resultados

Dentre as amostras clínicas testadas, foram escolhidas aquelas que apresentaram a melhor resposta frente ao antimicrobiano presente no extrato bruto produzido no cultivo do isolado *Streptomyces* 8S. Foram selecionadas duas cepas de cada espécie, conforme Tabela I. A escolha das amostras de *E. faecalis* foi devido a formação dos halos associados a melhor dispersão deste micro-organismo sobre a placa de Petri no momento da manipulação.

No ensaio para testar a produção do antimicrobiano usando como variável a fonte de carbono, observou-se que a sacarose foi a fonte de carbono mais efetiva, visando a maior produção do antimicrobiano em um menor tempo. Em 48h de crescimento já foi observada atividade antimicrobiana contra todas as amostras testes (Tabelas II). Quando o amido foi utilizado como fonte de carbono, pode-se observar uma ação contra todas as amostras testes somente após 72h de crescimento (Tabela III). Levando em consideração os resultados obtidos com as duas fontes de carbono, optou-se por usar a sacarose nos demais ensaios de otimização da produção do antimicrobiano. Conforme Tabela II, pode-se observar que o tempo de incubação de 72h foi o menor tempo de crescimento necessário para obtenção do extrato bruto com a melhor ação antibiótica contra as cepas testadas (Figura 1).

Tabela I: Perfil da atividade antimicrobiana do isolado *Streptomyces* 8S contra amostras clínicas incubado a 30°C por 7 dias com amido como fonte de carbono e sem controle de pH. Cepas destacadas foram as escolhidas para todos os ensaios.

Espécie	Cepa	D. H.	Origem
<i>E. faecium</i>	488	22	Urina
	1300	19,5	Urina
<i>E. faecalis</i>	2389	22,5	Urina
	2074	22,5	Sangue
	2688	25	Sangue
	2714	21	Sangue
	2499	22	Sangue
	2390	24,5	Sangue
	1854	23,5	Urina
	1885	22	Sangue
	1950	22,5	Urina
	1953	21,5	Urina
	2319	25	Urina
<i>S. aureus</i>	21	28,5	IRC
	28	23,5	IOS
	53	25	IRC, IOS
	103	24	DM/HAS/IRC/CI, IOS
	209	24	IRC, IOS
<i>S. epidermidis</i>	221	20	IOS
	229	22	IOS
	51	R	Não especificada

D.H.: diâmetro em mm do halo de inibição, R: Resistente, IRC: infecção renal crônica, DM: diabetes mellitus, HAS: hipertensão arterial, CI: insuficiência cardíaca, IOS: infecção em outro sítio.

Tabela II: Perfil da atividade antimicrobiana do extrato bruto produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S contra amostras clínicas durante 7 dias de crescimento a 30°C com sacarose como fonte de carbono.

Dias	<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	488	1300	2389	2688	21	53	221	229
1	14,5	12,5	17,5	15,5	19,5	18,5	0	13,5
2	23	23,5	27,5	26	26	25	20	24,5
3	24,5	25	27	25	28,5	27	21	25
4	25,5	24,5	24,5	25	25	26	20,5	25
5	25	25	28,5	25	24	26,7	S	S
6	25	22,5	28,5	25	21,5	23,5	S	S
7	21,5	19,5	23,5	21,5	20	19	S	S

Valores dos diâmetros dos halos de inibição (mm). S: sem medida.

Tabela III: Perfil da atividade antimicrobiana do extrato bruto produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S contra amostras clínicas durante 7 dias de crescimento a 30°C utilizando amido como fonte de carbono.

Dias	<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	488	1300	2389	2688	21	53	221	229
1	0	0	0	0	0	0	0	16,5
2	0	0	0	0	13,5	14,5	0	20,5
3	18,5	18,5	21,5	21,5	20	18	11,5	24,5
4	21,5	26,5	22,5	21	24	24,5	13,5	26
5	18	22	15,5	19	19,5	17	19,5	20,5
6	16,5	19	15	15	22,5	25	20	26
7	24,5	21,5	22,5	23,5	25	24,5	23	26,4

Valores dos diâmetros dos halos de inibição (mm).

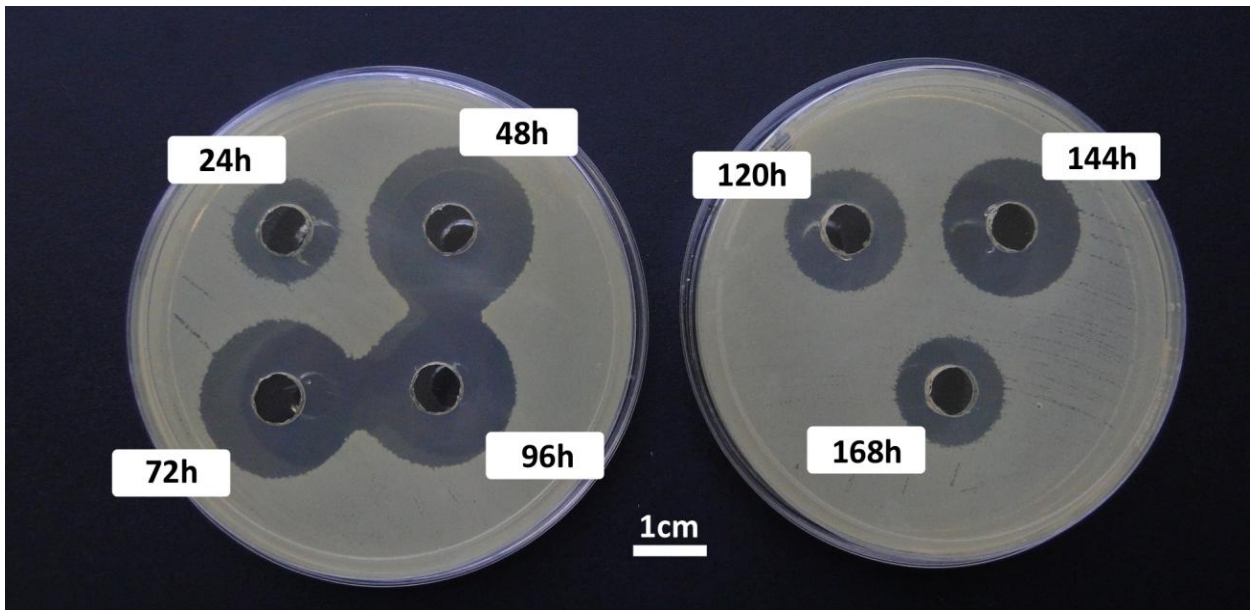


Figura 1: Ensaio de difusão em poço com extrato bruto produzido pelo isolado de *Streptomyces* sp. 8S testado contra *S. aureus* ATCC 29213. Os halos de inibição formados pela ação do composto antimicrobiano nos respectivos dias de crescimento. Meio de cultivo contendo sacarose como fonte de carbono e temperatura de cultivo de 30°C, sem controle de pH.

No ensaio onde sacarose foi a fonte de carbono utilizada no crescimento do isolado *Streptomyces* 8S, o extrato bruto apresentou a produção de halos de inibição duplos quando testado contra as duas cepas de *S. epidermidis* (Figura 2).

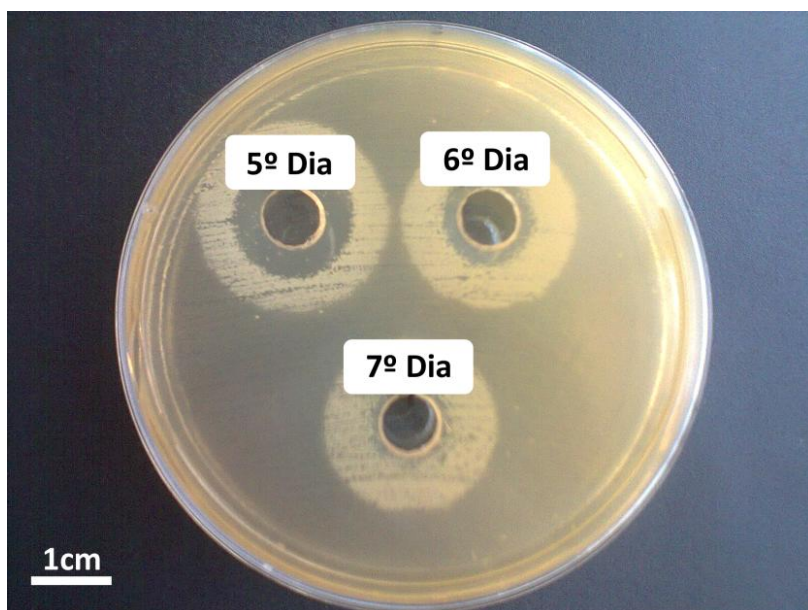


Figura 2: Ensaio de difusão em poço. Extrato bruto de *Streptomyces* sp. testado contra *S. epidermidis* 229. Halos de inibição formados pela produção do composto antimicrobiano nos respectivos dias de crescimento, com meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono e temperatura de cultivo de 30°C, sem controle de pH.

No ensaio para otimização da produção do metabólito, considerando o fator físico temperatura de incubação, foi observado que dentre as temperaturas testadas, de 30 a 55°C, o melhor resultado foi obtido com a temperatura de 30°C, considerando os maiores halos de inibição apresentados pela maioria das cepas testadas no menor tempo de incubação (Tabela IV). A 55°C o isolado parou de produzir o composto ou o mesmo era sensível a esta temperatura, no entanto não houve inibição no crescimento da biomassa.

Tabela IV: Perfil da atividade antimicrobiana do extrato bruto produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S contra amostras clínicas durante 72h de crescimento com sacarose como fonte de carbono nas diferentes temperaturas.

Temperatura	<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	488	1300	2389	2688	21	53	221	229
30°C	24,5	25	27	25	28,5	27	21	25
35°C	19,5	21,5	19,5	21	24,5	21	17,5	14,5
40°C	21,5	23,5	19,5	22	23	23,5	15,5	17,5
45°C	12	14	13,5	19	21,5	16,5	14	21,5
50°C	12	14,5	17	16	18	19	0	10

Valores dos diâmetros dos halos de inibição (mm).

No que diz respeito ao pH, o isolado *Streptomyces* 8S apresentou maior produção do antimicrobiano quando o meio de cultura foi tamponado com a solução de McIlvaine em pH 8,0 (Figura 3). Quando o tampão utilizado foi a solução de ácido bórico - cloreto de potássio 0,1M para o pH 9,0 e o pH 10,0 o isolado não apresentou atividade antibacteriana. Um novo teste foi realizado, com outra solução, a fim de verificar se os reagentes usados não foram responsáveis pela alteração no metabolismo da bactéria. Porém, com a solução de ácido aminoacético – hidróxido de sódio 0,1M também não foi detectada a presença do antibiótico, desta forma confirmando que no pH acima de 9,0 não há produção do antimicrobiano. Em todos os crescimentos com pH não tamponado, o estreptomiceto alterou o pH do meio de cultivo para valores em torno de 7,0 (Figura 4).

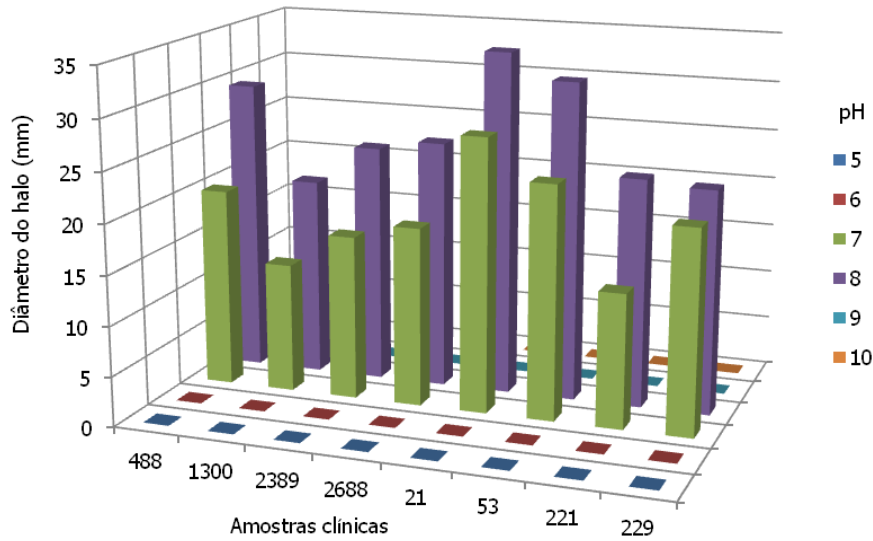


Figura 3: Gráfico demonstrativo da atividade antimicrobiana do isolado *Streptomyces* 8S com meio de cultura tamponado. Crescimento durante 72h com sacarose como fonte de carbono e temperatura de 30°C. Para pH de 5,0 a 8,0 foi utilizada a Solução Tampão de McIlvaine e para pH 9,0 e 10,0 a solução de ácido bórico-cloreto de potássio 0,1M.

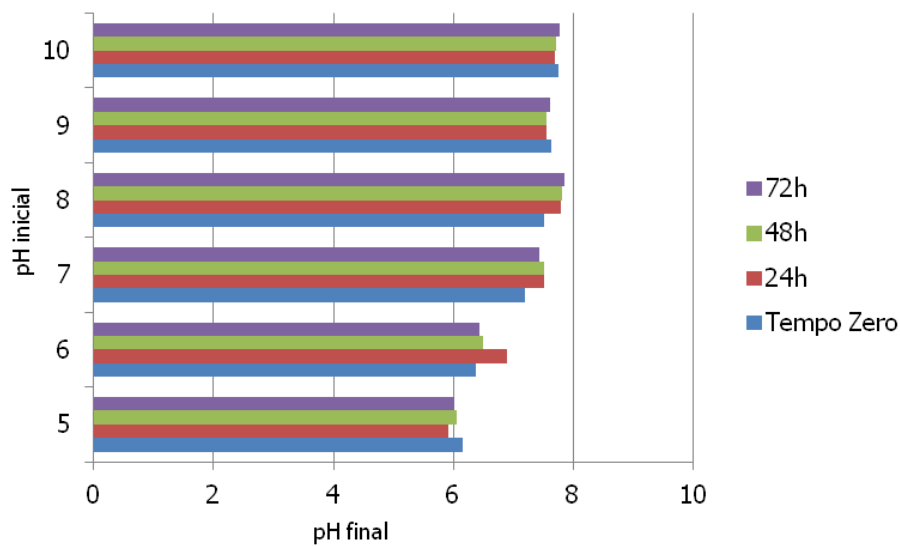


Figura 4: Gráfico demonstrativo da alteração do pH realizada pelo isolado *Streptomyces* 8S considerando os diferentes tempos de crescimento. O isolado alterou o pH inicial do meio de cultivo para valores próximos a 7,0.

Em pH ácido o isolado não foi capaz de produzir o antimicrobiano. Quando não houve tamponamento do meio de cultivo, o isolado foi capaz de produzir o composto antimicrobiano em pH 9,0 e 10,0, possivelmente pela alteração realizada no pH do meio no qual o isolado estava inserido (Tabela V).

Comparando-se os valores dos halos de inibição obtidos em todos os ensaios, foi escolhido pH 8,0 tamponado para dar continuidade na otimização do crescimento e produção do metabólito bioativo do isolado *Streptomyces* 8S.

Tabela V: Perfil da atividade antimicrobiana do extrato bruto produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S quando alterado o pH do meio de cultivo. Método de difusão em poço realizado com amostras clínicas após 72h de crescimento do isolado com sacarose como fonte de carbono e temperatura de crescimento de 30°C.

	<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	488	1300	2389	2688	21	53	221	229
pH sem tampão								
8	21	22	20	20,5	23	25	14,5	20,5
9	26	25,5	25	25,5	26	25	19,5	24,5
10	26	25	25	24	26	26	20	23,5
pH com tampão								
7	20	13	16,5	18	27,5	23,5	13,5	20,5
8	29,5	20	24	25	34,5	32	23	22,5

Valores dos diâmetros dos halos de inibição (mm).

Discussão

O uso da sacarose como fonte de carbono foi mais efetivo para a produção do composto bioativo produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S. O amido é uma molécula mais complexa do que a sacarose, possibilitando um aporte contínuo de energia para o crescimento bacteriano. No entanto, a redução da taxa de crescimento é um

importante sinal para desencadear o metabolismo secundário (Bibb 2005). A sacarose oferece uma fonte nutricional que atua no seu limite, fazendo com que o estreptomiceto produza os metabólitos secundários durante a maior parte do crescimento e não somente na fase estacionária. O crescimento do micro-organismo não está diretamente relacionado com a produção de extratos antimicrobianos, um organismo pode crescer sem produzir metabólitos com esta função, isto é, mesmo que o meio promova o crescimento do isolado, a produção de moléculas pode ser baixa. Thakur et al. (2009), ao testar a influência da nutrição na produção de metabólitos antimicrobianos produzidos por um isolado de *Streptomyces* sp. observaram que a capacidade de formação de zonas de inibição não estava correlacionada com o peso seco do micélio.

A presença de halos de inibição duplos, observados para espécie *S. epidermidis* pode ser resultado do efeito bacteriostático do composto frente a essa cepa. Também deve ser considerado que os duplos halos podem representar a existência de mais de um composto com atividade antimicrobiana. O aparecimento dos duplos halos utilizando extratos do quinto dia de cultivo pode indicar a presença de um novo composto sendo produzido após esse período. Ainda, o composto antimicrobiano pode ter uma maior dificuldade em difundir-se no agar, isto pelo tamanho da molécula ou pela sua composição química. A presença de mais de um composto bioativo em isolados de *Streptomyces*, muitas vezes com diferentes ações, é algo bastante comum (Intaradom et al. 2011; Smaoui et al. 2012). Entretanto, se o isolado produz mais de um antimicrobiano desde o início do seu crescimento, a presença destes pode ter uma ação sinérgica na inibição do crescimento das bactérias teste. Dessa maneira também,

se um dos compostos deixa de ser produzido depois do quinto dia, a falta deste pode ser a causa dos duplos halos, sendo o(s) composto(s) restante(s) incapaz(es) de inibir a bactéria.

O isolado 8S apresentou crescimento em temperaturas bastante altas, fato este já esperado uma vez que o isolado é oriundo de um processo de compostagem, onde as temperaturas podem exceder 60°C (Xu et al. 2010). Porém, a partir de 40°C a produção do composto antimicrobiano começou a declinar. Embora a verdadeira função dos metabólitos secundários no ambiente não esteja bem estabelecida (Raijmakers & Mazzola 2012), pode-se especular que a produção dos compostos antimicrobianos seja um importante fator para a competição existente no solo, visto que 30°C, temperatura onde obteve-se a maior produção do antimicrobiano presente no isolado 8S, é a temperatura ideal para a maioria dos micro-organismos presente neste ambiente. O pH das composteiras sofre alterações dependentes dos micro-organismos que ali crescem, como visto por Choi e Park (1998). O pH alcalino favorece o crescimento de micro-organismos como os actinomicetos, fato este que corrobora com o resultado obtido de maior produção do composto em pH 8,0.

Lewis (2012) questiona se perdemos a habilidade de descobrir novos compostos antimicrobianos. Isto devido ao fato de que o grande potencial esperado na descoberta de novas drogas através das técnicas modernas de biologia molecular não foi alcançado. Porém, as moléculas com potencial biológico não se saturaram, mas houve falhas nos mecanismos de investigação. Sugere-se utilizar as ferramentas atuais de pesquisa com auxílio das técnicas de microbiologia básica bem sucedidas no passado. Segundo Carlet et al. (2012), os antibióticos continuam sendo tratados como

drogas comuns e sendo livremente receitados por agentes da saúde sem o treinamento adequado. Tendo em vista a clara disseminação dos genes de resistência, é urgente a necessidade de novas moléculas com atividade antimicrobiana e, além disso, de novos esforços que unam a tecnologia das metodologias moleculares com o já conceituado padrão tradicional.

Agradecimentos

Aos professores Pedro d’Azevedo e Ana Lucia Antunes pela doação das amostras testes. Ao Voltaire Paes pela ajuda com as imagens. À Themis Antunes pelo ensinamento da metodologia.

Referências

Antunes, T 2013. Avaliação de moléculas bioativas produzidas por isolados de actinomicetos contra cocos Gram-positivos de origem clínica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 87pp.

ANVISA. Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [updated 2009 July 23; cited 2013 Jun 16]. Available from:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/imprensa>

Alvan G, Edlund C, Heddini A 2011. The global need for effective antibiotics – a summary for plenary presentatios. *Drug Resistance Updates* 14: 70-76.

Arias C, Murray B 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10: 266-278.

Basilio A, González I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, González A, Genilloud O 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol* 95(4): 814-23.

Bérdy J 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58(1):1-26.

Bibb M 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* 8: 205-215.

Carlet J, Jarlier V, Harbarth S, Voss A, Goossens H, Pittet D 2012. Ready for a world without antibiotics? The peninsular antibiotic resistance call to action. *ARIC* 1: 11-24.

Chambers H, DeLeo F 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7: 629- 641.

Choi M, Park Y 1998. The influence of yeast on thermophilic composting of food waste. *Letters in Appl Microbiol* 28: 175-178.

Hassan M, El-Naggar M, Said W 2001. Physiological factors affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violates* in bath cultures. *Egyptian J Biol* 3:1-10.

Intaraudom C, Rachtawee P, Suvannakad R, Pittayakhajonwut P 2011. Antimalarial and antituberculosis substances from *Streptomyces* sp. BCC26924. *Tetrahedron* 67: 7593-7597.

Kurtboke D 2012. Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 1845-1852.

Lewis K 2012. Recover the lost art of drug discovery. *Nature* 485: 439-440.

Neu H 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1064-1073.

Oliveira M 2003. *Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 140 pp.

Otto M 2009. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7: 555-567.

Panesso D, Reyes J, Rincón S, Díaz L, Galloway-Peña J, Zurita J, Carrillo C, Merentes A, Guzmán M, Adachi J, Murray B, Arias C 2010. Molecular epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South America hospitals. *J of Clin Microbiol* 48: 1562-1569.

Raaijmakers J, Mazzola M 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 50: 403-424.

Salamoni S, Mann M, Campos F, Franco A, Germani J, Van Der Sand S 2010. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. *World J Microbiol Biotechnol* 26: 1847-1856.

Smaoui S, Mathieu F, Elleuch L, Coppel Y, Merlina G, Karray-Rebai I, Mellouli L 2012. Taxonomy, purification and chemical characterization of four bioactive compounds from new *Streptomyces* sp. TN256 strain. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 793-804.

Tang K, Zhu R, Cao Z 2011. Discrimination of approved drugs from experimental drugs by learning methods. *BMC Bioinformatics* 12: 157-164.

Thakur D, Bora T, Bordoloi G, Mazumdar S 2009. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *J Mycol Med* 19: 161-167.

Waksman S, Henrici A 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol* 46:4 337-341.

Xu S, McAllister T, Leonard J, Clark O, Belosevic M 2010. Assessment of microbial communities in decomposition of specified risk material using a passively aerated laboratory-scale composter. *Comp Science Utilization* 18: 255-265.

Yoneyama H, Katsumata R 2006. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(5): 1060-1075.

Anexo

Instruções da revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz para envio de artigo.



Instructions to authors

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References

Must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.
[CLICK HERE \(+\)](#)

Figures and tables must be understandable without reference to the text

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures

should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Technical Notes: Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 double-spaced typed Word file maximum). The text must not be divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time. Complementary tables and figures may be published as supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Short communications: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.icmje.org/journals/resource/uniform.htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication. Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these instructions.

In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.

A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

an affidavit, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;

a copyright assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.