

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE  
STREPTOMYCES E ESTUDO DE PRODUÇÃO DE MOLECULAS BIOATIVAS**

**SABRINA PINTO SALAMONI**  
BIÓLOGA- UFRGS  
MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Porto Alegre, RS. Brasil  
Dezembro de 2009

Catálogo na Publicação  
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

S159a Salamoni, Sabrina Pinto

Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* e estudo de produção de moléculas bioativas / Sabrina Pinto Salamoni. – 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Sueli Teresinha van der Sand

Co-orientação: Prof. José Carlos Germani

1. *Streptomyces* 2. Atividade antimicrobiana 3. Compostos bioativos I. Sand, Sueli Teresinha van der, orient. II. Germani, José Carlos, co-orient. III. Título.

CDU 579.87 (043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE  
STREPTOMYCES E ESTUDO DE PRODUÇÃO DE MOLECULAS BIOATIVAS**

**SABRINA PINTO SALAMONI**  
BIÓLOGA- UFRGS  
MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Tese apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre - RS. Brasil  
Dezembro de 2009

## **Agradecimentos**

À Dra. Sueli T. Van Der Sand pela orientação, incentivo, paciência e participação na realização deste trabalho.

Ao Dr. José Carlos Germani pela co-orientação e auxílio.

Às colegas e amigas Michele Bertoni Mann e Themis Collares por participarem ativamente na execução deste projeto. Sempre com muita dedicação.

Ao colega Fabrício Campos pela amizade e colaboração.

À prof. Dr. Ana Claudia Franco pelo auxílio e colaboração.

Aos colegas de laboratório Margaroni Fialho de Oliveira, Julie Zanin, Karina Heck, Raquel Damasceno, Daniele Oliveira, Mariana Wanderley, Paola e Viviane Juliano, pela amizade, companheirismo e incentivo.

À minha mãe, Cheila Pinto Salamoni e irmãos, pelo incentivo, dedicação e por compreenderem minha ausência.

Ao meu namorado, Frederico Luwig, pelo seu amor, carinho e por ser meu maior incentivador.

A CAPES pelo auxílio financeiro ao longo destes quatro anos.

# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE STREPTOMYCES E ESTUDO DE PRODUÇÃO DE MOLECULAS BIOATIVAS

Autor: Sabrina Pinto Salamoni<sup>1</sup>  
Orientador: Sueli T. V Der Sand  
Co-orientador: José Carlos Germani

## RESUMO

O gênero *Streptomyces* é conhecido por produzir uma ampla variedade de moléculas bioativas como antimicrobianos, enzimas, agentes antitumorais, antivirais, promotores de crescimento, entre outros. Pesquisas com este grupo de microrganismos têm sido realizadas há mais de 60 anos, no entanto, estudos recentes demonstram que este grupo representa uma fonte inesgotável de novas moléculas bioativas. Neste trabalho, foi avaliada a atividade antimicrobiana de 25 isolados de *Streptomyces*. Para tanto foram empregados 53 microorganismos teste, incluindo bactérias Gram positivas, Gram negativas, leveduras e fungos filamentosos. A atividade antimicrobiana foi determinada pela técnica da dupla camada. Os isolados que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram cultivados em cultura submersa, sob diferentes condições de cultivo (meio de cultivo, tempo e temperatura). Dos 25 isolados 80 % apresentaram atividade antimicrobiana, destes 80% apresentaram atividade antibacteriana e 45% atividade antifúngica. Dos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana 40% apresentaram um amplo espectro, inibiram mais de dez microrganismos teste. Duas linhagens identificadas como *Streptomyces* sp 1S e *Streptomyces* sp. 50 foram selecionados para estudos de produção e caracterização. *Streptomyces* 1S inibiu 46 microrganismos teste e o isolado 50 foi ativo especialmente contra *Enterococcus* multiresistentes. A caracterização morfológica, bioquímica e a análise da seqüência parcial da região 16S do rDNA, demonstram a grande diversidade deste grupo de microrganismos e auxiliaram na identificação em nível de gênero. As melhores condições para a produção de metabólitos bioativos, bem como a caracterização destes isolados são reportados no presente estudo. Foi observado que as condições ambientais e do substrato são fundamentais na produção de metabólitos secundários especialmente antimicrobianos.

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, microbiologia Industrial, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 150 p, Dezembro, 2009.

# ANTIMICROBIAL ACTIVITY EVALUATION OF STREPTOMYCES ISOLATES AND THE STUDY OF BIOACTIVE MOLECULES PRODUCTION

Autor: Sabrina Pinto Salamoni<sup>1</sup>  
Orientador: Sueli T. V Der Sand  
Co-orientador: José Carlos Germani

## ABSTRACT

*Streptomyces* genus are well-known due to its high capacity to produce innumerable bioactive metabolites such as, enzymes, antitumour agents, immunomodifying agents, vitamins, growth promoters, and antibiotic compounds among others. Research with this group of microorganisms has been realized since the sixties. However, more recent research has shown that this group still is a very important resource of new secondary metabolites, especially antibiotics. In this work the antimicrobial activity of 25 *Streptomyces* strain, was evaluated against 53 test microorganisms including Gram positive and negative bacteria, filamentous fungi and yeasts with clinical and agricultural interest. The antimicrobial activity in the first screening was realized using the double layer method. The strains that showed potential results in the first screening were grown on submerged culture in different growth conditions of temperature, culture media and time of growth. From the 25 *Streptomyces* isolates tested 80% showed antimicrobial activity, out of that 80% presented antibacterial activity and 45% antifungal activity. Out of the isolates that showed antibacterial activity 40% presented a wide spectrum of activity, inhibiting more than 10 microorganisms. Two strains were selected for further studies, *Streptomyces* sp. 1S and *Streptomyces* sp. 50. Isolate 1S was chosen because it was able, in the antimicrobial screening, to inhibit 46 test microorganisms. Isolate 50 showed especial activities against multiresistant *Enterococcus* sp. This two isolates were submitted to morphological and biochemical characterization and the analysis of partial 16S rDNA sequence was done. The results confirmed the high diversity of this genus, and with the results obtained only the genus was possible to be confirmed. The best growth conditions for metabolites production and the characterization of the isolates are described in this work. It has been observed that the environmental conditions are extremely important for the production of secondary metabolites, especially antibiotics.

<sup>1</sup> Doctoral Thesis in Environmental and Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 150 p, December, 2009.



## INTRODUÇÃO

*Streptomyces* são bactérias Gram positivas que se diferenciam de outras bactérias por sua morfologia colonial, apresentando hifas que formam uma rede micelial, extensivamente ramificada sobre o substrato e no micélio aéreo. Estes microrganismos apresentam um complexo ciclo de vida, e apresentam um cromossoma linear com tamanho que varia de espécie para espécie podendo atingir até 9 Mb. A estrutura e o tamanho do genoma refletem a grande diversidade morfológica, bioquímica e de metabólitos produzidos por este grupo de microrganismos. Streptomyces produzem diferentes moléculas com atividade antimicrobiana, especialmente antibióticos pertencentes a classe dos aminoglicosídeos, macrolídeos, lipopeptídeos, glicopeptídeos, tetraciclina e estreptograminas, além de compostos antitumorais, antivirais e antiparasitários. Nos últimos anos tem sido observada a emergência de microrganismos



resistentes/multiresistentes aos diferentes antibióticos comumente empregados na terapia humana. A disseminação de genes de resistência entre diferentes populações microbianas representa um problema de saúde pública, uma vez que muitos dos antibióticos disponíveis comercialmente são ineficientes para o controle e tratamento de infecções causadas por estes microrganismos. Considerando o grande potencial do gênero *Streptomyces* e frente a necessidade por novos compostos bioativos, este trabalho teve por objetivo: avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes isolados de *Streptomyces* provenientes de processo de compostagem, frente a microrganismos de interesse clínico e fitopatógenos; selecionar isolados com potencial biotecnológico, avaliar a influencia de diferentes condições de cultivo sobre a produção de metabolitos bioativos e proceder a caracterização dos microrganismos produtores, a partir de análise morfológicas, bioquímicas e de biologia molecular, bem como de seus produtos.

# REVISÃO BIBLIOGRAFICA

## 1. Gênero *Streptomyces*

Taxonomicamente, o gênero *Streptomyces* pertence à família Streptomycetaceae, são membros da ordem Actinomycetales, dentro da classe Actinobacteria. São bactérias Gram positivas, aeróbias e apresentam um alto conteúdo de citosina e guanina em seu genoma. Estes microrganismos produzem uma variedade de pigmentos responsáveis pela cor do micélio sob o substrato e micélio aéreo. São quimiorganotróficos, crescem dentro na faixa de pH entre 5 e 11,5. Membros deste gênero podem ser distinguidos de outros actinomicetos pelo tipo de parede celular, com ácido L- diaminopimélico e glicina (Lechevalier & Lechevalier, 1967, Dietz & Mathews, 1971, Anderson & Wellington, 2001).

Streptomicetes colonizam diferentes ambientes por meio de hifas multinucleadas que formam uma rede micelial e podem ser encontrados numa grande diversidade de habitats. Perfazem cerca de 30% da microbiota do solo, são capazes de colonizar ambientes aquáticos (lagos, rios, mares), podem também ser isolados de plantas e animais, e incluem espécies acidófilas e alcalotolerantes, halofílicas e termotolerantes (Li et al., 2005, Nedialkova & Naidenova 2005, El-Shaloury et al., 2009, Khamnn et al., 2009, Sajid et al., 2009).

O nome do gênero foi proposto por Waksman e Henrici (1943), e surgiu da combinação dos dois primeiros actinomicetos descritos *Stepthrotrix* e *Actinomyces*, o agente da actinomicose *A. bovis* (1839), isolados pelo pesquisador Cohn (Stackebrandt, 2006).

*Streptomyces* apresentam um complexo ciclo de vida, com diferenciação morfológica e fisiologia complexa. A diferenciação destes microrganismos envolve o crescimento e ramificação de hifas vegetativas sobre o substrato e sua diferenciação morfológica se dá a partir do crescimento de hifas aéreas, seguido a septação que gera cadeia de esporos unigenômicos (Claessen et. al., 2006).

Membros do gênero *Streptomyces* apresentam cromossomo linear, o que não é peculiar a este grupo de microrganismos, estando também presente em *Borrelia*, *Agrabacterium* e outros actinomecetales. Enquanto plasmídeos lineares são encontrados em uma variedade de actinomicetos, cromossomas lineares estão restritos a espécies com sofisticada estrutura e ciclo de vida como

*Streptomyces*, *Nocardia*, *Streptoverticillium*, *Saccharopolispora*, *Actinoplanses*, *Micromonospora*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Rhodococcus* (Chen et al., 2002).

Apesar de não serem os únicos a apresentar cromossoma linear, *Streptomyces* diferenciam-se dos demais gêneros quanto a estrutura e tamanho do genoma que varia de espécie pra espécie podendo atingir até 9 Mb, o que reflete seu complexo ciclo de vida e metabólitos secundários. As extremidades do cromossoma de *Streptomyces* apresentam telômeros com proteínas covalentemente ligadas, o que permite assumir forma circular sob condições naturais ou em laboratório. Estas regiões terminais apresentam também regiões palindrômicas, seqüências repetitivas invertidas e codificam principalmente funções relacionadas à regulação, transporte, secreção, diferenciação e biosíntese de antibióticos (Leblond et al., 1996).

Volf e Atenbuchner (2001) propõem que os cromossomos lineares em *Streptomyces* evoluíram a partir da recombinação entre plasmídeos lineares e um cromossoma linear ancestral, assim alguns importantes genes originalmente presentes em plasmídeos permaneceriam na região terminal dos cromossomas lineares e vários genes de transposases e vias biosintéticas de metabólitos secundários.

A instabilidade genética destes microrganismos é conhecida há décadas, onde tem sido observado que vários marcadores genéticos (resistência e biosíntese de antibióticos, pigmentos, proteínas extracelulares, relacionados a

formação de hifas aéreas e esporos) foram perdidos em várias combinações a frequência de  $10^{-4}$  a  $10^{-2}$  por esporos. Estas perdas não são em virtude da perda de plasmídeos, mas sim por grandes deleções cromossomais (2 Mb). Em média, o cromossoma de 0,5% dos esporos que germinam é afetado por deleções que removem até 25% do seu genoma. A linearidade cromossomal não é a maior causa da instabilidade, mas sim a presença abundante de elementos transponíveis, principalmente nas regiões terminais (Volf &, Leblond, 2000, Chen et al., 2002).

Actinomicetos, especialmente espécies do gênero *Streptomyces* são prolíficos produtores de moléculas bioativas como enzimas, antibióticos, antitumorais, efetores de crescimento, entre outros. A produção de metabólitos secundários geralmente coincide ou precede o desenvolvimento da hifa aérea em culturas crescidas sobre superfícies (Bibb, 2005).

## **2. Identificação**

Desde a descoberta dos primeiros antibióticos a crescente busca por novos microrganismos e por novas moléculas bioativas levou a superestimativas e a descrição de espécies sinônimas. Para resolver este problema, em 1964 o Projeto Internacional *Streptomyces* (ISP) estabeleceu critérios e metodologias para caracterizar e auxiliar a identificação de *Streptomyces*. Esta tentativa de classificação inclui características morfológicas, como ramificações das hifas, presença de hifas sob o substrato e hifas aéreas, arranjo da cadeia de esporos,

superfície do esporo, características bioquímicas e fenotípicas. Neste estudo foram avaliados 151 caracteres e 475 cepas, incluindo 394 culturas de *Streptomyces*. Estes isolados foram agrupados em 19 grandes grupos, 40 grupos menores e 18 grupos de espécie única. Os grupos menores apresentam de duas a cinco cepas, enquanto que os grupos maiores apresentam de seis a 71 linhagens. Embora avalie somente características morfológicas e bioquímicas esta classificação ainda é empregada para este grupo de microrganismos (Willians et al., 1982, Willians et al., 1989, Meyers et al., 2003, Xu et al., 2005).

Outros métodos quimiotaxonômicos, assim como composição de ácidos graxos, sorologia, fagos, perfil de proteínas tem sido empregados (Lechevalier & Lechevalier, 1967, Dietz and Mathews, 1971, Anderson & Wellington, 2001).

Mais recentemente técnicas de biologia molecular tem sido empregadas para uma melhor caracterização deste grupo de microrganismos como análise da região 16S rDNA, principalmente das regiões variáveis como alfa (posições 982-998), beta (1110-1122) e gama (150-200) em *S. ambofaciens*. Análises da região 23S e 5S, assim como intergênica também tem sido empregada para avaliar a diversidade e filogenia destes microrganismos. Estas seqüências têm sido analisadas por diferentes técnicas como DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Estas análises têm permitido uma melhor caracterização dos isolados assim como

permite avaliar as relações interespecíficas e intraespécies (Mehling et al., 1995, Kataoka et al., 1997, Park & Kilbane, 2000).

Embora estudos polifásicos sejam realizados envolvendo caracteres bioquímicos e moleculares, o emprego ainda é restrito em virtude da carência de informação. Atualmente cerca de 25% das espécies validadas tem disponibilizado informações parciais da sequência de nucleotídeos da região 16S (Lannot et al., 2004).

Até o presente, duas espécies de *Streptomyces* tiveram seu genoma completo seqüenciado, *S. coelicolor* e *S. avermitilis*, com tamanho de 8.667.507 pb e 9.025.608 pb respectivamente (Lebland et al., 1996). Dois importantes aspectos do genoma, o tamanho e a presença de regiões repetidas invertidas. As regiões terminais são espécies específicas e contém poucos genes conservados. Em 2003 havia 373 espécies de *Streptomyces* validadas, atualmente já foram reportadas 562 pertencentes a 38 subespécies e o número de candidatos é crescente (Kaltenpoth, et al., 2006, Küpper, 2006, Euzeby, 2009).

Em virtude do grande número de espécies reportadas e candidatos a novas espécies, estudos polifásicos têm apresentado boa congruência entre os dados fenotípicos e genotípicos o que tem corroborado para melhor caracterizar este grupo tão diverso de microrganismo (Atalan et al., 2000, Kim et al. 2006).

Estudos recentes têm empregado características morfológicas, bioquímicas, quimiotaxônomicas e de biologia molecular, e tem proposto inúmeras novas espécies. Embora a identificação em nível de gênero seja relativamente

simples, a caracterização em espécie ainda hoje é dificultada em virtude da grande diversidade deste grupo e da ausência de padrões, onde a definição de espécie ainda não é clara (Meyers et al., 2003, Saintpierre et al., 2003, Xu et al., 2005, Kim et al., 2006).

### **3. Diferenciação morfológica**

Streptomycetes apresentam um complexo processo de diferenciação morfológica, similar aos fungos filamentosos, e único em bactérias. Estes microrganismos crescem como hifas ramificadas formando um extenso micélio vegetativo, com diferenciação em micélio aéreo e posterior dispersão de esporos. A extensão da hifa se dá por crescimento apical e é mediado principalmente da proteína DivIVA, que está envolvida no processo de formação de novos pontos de ramificação na hifa e na sua extensão. Enzimas envolvidas exportam peptidoglicano, assim como outros componentes como ácido teicóico, proteínas de superfície e lipídeos que passam a ser secretados e incorporados na zona de crescimento (Willey et al., 2006, Flärdh & Buttner, 2009).

A diferenciação morfológica é também dependente da produção de diferentes surfactantes, como a surfactina de *S. tendae* que tem função similar as hidrofobinas em fungos filamentosos, que auxiliam o crescimento rompendo a barreira de tensão entre o meio e o ar. Este surfactante cobre a superfície da hifa aérea formando uma camada com uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, que



interage diretamente com a hifa e com o meio externo respectivamente (Richter et al., 1998).

A produção e outros tipos de surfactantes como SapB, um peptideosurfactante, que reduz a tensão superficial da água de 72 para 32  $\text{nJm}^{-2}$  são de extrema importância no processo de diferenciação morfológica, pois diminui a barreira física e facilita o crescimento da hifa. Esta molécula somente é expressa em meio de cultivo rico. Na ausência deste ou em mutantes SAPB outros metabólitos são sintetizados e exercem uma função similar como acontece em *S. coelicolor*. (Claessen et al., 2006, Willey et al., 2006).

A via independente de SAPB é mediada por proteínas hidrofóbicas denominadas de chapilinas e rodlinas, que são expressas em diferentes condições de cultivo. As chapilinas formam um filamento amilóide sobre a superfície da hifa ficando assim na interface. As rodlinas, por sua vez, também envolvem a hifa aérea e os esporos, intercaladas, formando sobre a superfície da hifa uma camada altamente insolúvel (RdIA e RdIB). Tanto SapB como chapilinas tem forte atividade surfactante na interface (Willey et al., 2006, Flärdh e Buttner, 2009).

Uma vez formada a hifa aérea, ocorre o processo de diferenciação das células em cadeia de esporos. Durante o desenvolvimento inicial, um longo e não septado compartimento apical forma uma cadeia de esporos, chamada célula esporângica (com alto nível de replicação, com 50 ou mais cópias de cromossomas) que sofre múltiplas divisões celulares, sincronicamente, com septação levando a formação de paredes cruzadas, processo este mediado por

várias proteínas (Ftsw, FtsI, FtsQ, e DivIVC, MreA) e subsequente agregação do cromossoma em esporos unigenômicos. *Streptomyces* utilizam dois tipos de divisão celular, a septação vegetativa que leva a formação de paredes cruzadas no micélio sobre o substrato e a septação para a formação dos esporos (Flärdh, 2003, Tseng et al., 2006, Flärdh & Butnner, 2009).

Estes microrganismos apresentam um ciclo complexo de diferenciação morfológica onde a morte programada das células do micélio sobre o substratos suportam o crescimento e diferenciação do micélio aéreo que induz apoptose para que os produtos da lise celular possam ser empregados para a formação dos esporos (Chen et al., 2002).

#### **4. Produtos naturais**

Desde a descoberta de Fleming até os nossos dias atuais, centenas de produtos naturais derivados de fonte microbiana têm sido reportados. Inicialmente foi observado um aumento exponencial de novos metabólitos, incluindo não antibióticos. Em 1940 cerca de 10-20 substâncias foram reportados, entre 1950 e 1960 o número cresceu para 400 novos produtos, já em 1970 foram reportados 2800 e em 2002 o número de moléculas bioativas ultrapassava 22000. Da descoberta dos primeiros antibióticos, 1940 até 1970, a conhecida era do ouro, foi descrita uma grande diversidade de antibióticos pertencentes às principais classes como sulfonamidas, beta-lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas e estreptograminas. Embora o período do ouro tenha

mostrado um crescimento exponencial em relação ao número e tipos de antimicrobianos, nos últimos tempos, a descoberta de novos antibióticos parece não crescer muito. Os antibióticos empregados hoje pertencem na sua maioria, as mesmas classes descobertas a mais de 40 anos atrás, são derivados semisintéticos e sintéticos, correspondendo a antibióticos de terceira e quarta geração. Cefalosporinas e outros derivados semisintéticos perfazem 65% dos novos químicos comercialmente disponíveis. De 1960 até os dias atuais, três novas classes de antibióticos foram introduzidas, as oxazolidinonas (linezolidas - composto sintético), lipopeptídeos (daptomicina) e multilinasos. Estes compostos foram descobertos a mais de 20 anos, mas foram introduzidos recentemente (Demain, 1998, Diekema & Jones, 2000, Myles, 2003, Fischbach & Walsh, 2009).

Na busca por novos produtos, a aplicação de bioinformática e análise genômica tem se mostrado como ferramentas poderosas. Estas técnicas permitem identificar genes e reconhecer parcial ou completamente a seqüência de diferentes moléculas com potenciais aplicações, sendo estas identificadas a partir da sua expressão através do cultivo de microrganismos (Gullo et al., 2006, Charan et al. 2007 )

Procariotos produzem cerca de 50000 compostos, 22000 são bioativos e cerca de 16500 apresentam atividade antibiótica. Entre procariotos, as bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mixobacterias* e cianobacterias são responsáveis pela produção de 17% (3800) do total de compostos bioativos microbianos, fungos representam 38% da produção e actinomicetales

representam 45% (10000). Entre os actinomicetales, *Streptomyces* produzem cerca de 70-80% dos metabolitos secundários (7600), sendo os restante (2400) produzidos por diferentes gêneros como como *Saccharopolispora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Microbispora*, *Streptosparangium* e *Actinoplanes*. Dos 16500 antibióticos, somente cerca de 150 tem uso direto na medicina humana, veterinária e na agricultura (Demai, 1998, Challis & Hopwood, 2003, Berdy, 2005, El-Tarabity & Sivassthamparam, 2006).

#### **4.1 Metabólitos secundários**

Metabólitos secundários são moléculas não essenciais para o crescimento, manifestando-se em diversas interações como antagonismos, sinergismos, exercem efeito regulatório ou modulador entre microrganismos e outros sistemas vivos, como plantas, microfauna, mesofauna e animais. Estes compostos podem inibir ou causar a morte do organismo alvo, podendo ser específicos ou não (efeito tóxico). Estes compostos conferem vantagens competitivas ao organismo produtor, e podem também ter ação como molécula sinalizadora (*quorum sensing*) (Demai, 1998, Berdy, 2005).

Antibióticos são metabólitos secundários isolados de microrganismos e que exibem atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica, antiprotozoário), antitumoral e antiviral. Estes metabólitos têm ação em diferentes processos celulares, como a replicação e a síntese de macromolécula em células

procarióticas e/ou eucarióticas, sendo ativos em baixas concentrações (Berdy, 2005, El-Shaloury et al., 2009)

Em *Streptomyces*, antibióticos são produzidos em pequenas quantidades na fase de transição, no desenvolvimento inicial entre o micélio vegetativo e micélio aéreo. Estes microrganismos produzem uma variedade de antibióticos com estrutura e mecanismo de ação distinta como aminoglicosídeos, macrolídeos, polienos, glicopeptídeos, antraciclinas, novobiocinas, poliéteres e derivados de lactonas, entre outros. Os metabólitos produzidos por estes microrganismos apresentam estruturas mais complexas e mais diversas, com massa molecular médio de 800-2000 enquanto que metabólitos fúngicos e de outras bactérias produzem compostos com 200-400. Muitos dos metabólitos produzidos por estreptomicetes apresentam ação sinérgica, como observado em *S. clavuligerus*, *S. jumonziensis* e *S. katsurahamanus* com a coprodução de beta-lactâmicos (cefamicina) e ácido clavulânico e as estreptograminas (Challis & Hopwood, 2003, Tahlan et al., 2004).

#### **4.2 Regulação da produção de metabólitos secundários**

Os genes relacionados à produção de metabólitos secundários estão organizados em *clusters* e incluem genes que codificam as enzimas biosintéticas, proteínas reguladoras, genes de resistência e genes de secreção. Antibióticos são caracterizados por apresentar massa peso molecular e são complexos em estrutura, comumente 10-50 genes podem ser requeridos para codificar a síntese

de uma molécula com massa molecular < 1000, em contraste um único gene pode codificar uma proteína de 100 KDa (Bibb, 2005, Martin et al., 2005, Cundliffe, 2006).

Diferentes espécies de *Streptomyces* (*S. coelicolor*, *S. griseus*, *S. avermitilis*) apresentam em seu cromossoma linear, cerca de 25 a 36 clusters de genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários. *S. avermitilis* possui um genoma de 8,7 milhões de pb, é reportado que 6,4% dos genes estão envolvidos na síntese e regulação de metabólitos secundários, o que corresponde a cerca de 25 *clusters*. Este microrganismo produz um antibiótico, a avermectina, cuja síntese envolve oito *clusters* (Demain, 1998, Omura et al., 2001, Kwangwon, 2006).

O metabolismo secundário é regulado 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. Produtos do metabolismo primário podem fornecer precursores, como moléculas intermediárias das vias sintéticas ou enzimas (Demain, 1998, Gupte et al., 2002, Martin, 2005).

Microrganismos são capazes de utilizar uma grande variedade de substratos, o entanto, muitos destes podem ter efeito negativo sobre alguns processos. A repressão catabólita de carbono é amplamente distribuída em sistemas microbianos e a sua função primária é garantir uma organizada e sequencial utilização de fontes de carbono, quando mais de um substrato está

presente. Em actinomicetos, a glicose inibe a produção de vários metabólitos secundários como actinomicina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, tetraciclina e tilosina. A glicose neste contexto é empregada na tropofase, enquanto outros substratos, como polissacarídeos, oligossacarídeos e óleos são empregados para a produção de metabólitos secundários. Assim como a fonte de carbono, o nitrogênio também regula a produção de diferentes moléculas. Tem sido reportado o efeito inibidor de sais de amônio em processos de produção de antibióticos especialmente de aminoglicosídeos e o efeito indutor de fontes protéicas e complexas (Sanchez & Demain, 2002).

Mecanismos de ativação por controle positivo, consistem em sua maioria por proteínas reguladoras de vias específicas SARPs (*Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins*). ActII-ORF4 e RedD são ativadores transcricionais, a deleção ou inativação do respectivo gene usualmente inibe a produção do antibiótico em *S. coelicolor*. Similarmente, Ccar liga-se a várias regiões promotoras dentro do *cluster* da cefamicina e ativa a transcrição deste antibiótico e do ácido clavulânico em *S. clavuligerus*. (Bibb, 2005, Cundliffe, 2006).

Streptomycetes são prolíficos produtores de metabólitos secundários e substâncias biologicamente ativas. A produção destes compostos por sua vez é controlada por moléculas de baixa massa molecular, autoreguladoras, denominados butirolactonas. A maioria desses compostos possui como característica estrutural comum, a presença de um esqueleto  $\gamma$ -butirolactônico 2,3-dissubstituído, mas mostram pequenas diferenças estruturais na cadeia lateral.

Em *Streptomyces* as butirolactonas são amplamente produzidas, mas seu papel varia de espécie para espécie. Estas moléculas podem regular a produção de antibióticos e ou diferenciação morfológica com similar função às N-acyl-homoserinas lactonas (AHLS) em proteobactérias. Elas ocorrem não somente em espécies de *Streptomyces*, mas também em outros actinomicetales (Cundliffe, 2006, Kwangwon, 2006, Takano, 2006). São moléculas indutoras que atuam por controle negativo, isto é, ligam-se às proteínas repressoras que normalmente impede o metabolismo secundário e morfogênese e as inativam (Demain, 1998).

Takano (2006) reportou 14 diferentes butirolactonas em sete espécies de *Streptomyces* (*S.*, *griseus*, *S. coelicolor*, *S. lavendulae*, *S. virginiae*, *S. viridochromogenes*, *S. bikiensis* e *S. cyaneofuscalis*) onde sua função é regular a produção de antibióticos e são requeridas em baixas concentrações (nanomolar).

O Fator A (2 – isocapryloyl-3R-hydroxymethyl-gama-butyrolactone) foi a primeira molécula de butirolactona descrita, por volta de 1960. Em *S. coelicolor*, o fator A está associado a produção de antibiótico e a diferenciação morfológica. (Bibb, 2005, Cundliffe, 2006, Flårdh & Butnner, 2009).

## **5. Microrganismos de Interesse**

### **5.1 Microrganismos de interesse clínico**

Para sobreviver em todos os organismos vivos necessitam adaptar-se ao seu ambiente, desenvolvendo diferentes mecanismos para suportar as variações ambientais como alterações de temperatura, disponibilidade de



nutrientes, água e em alguns casos, de oxigênio, entre outros. Não é surpreendente que muitas bactérias desenvolvam mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos. A aquisição de genes de resistência a antibióticos, seja natural (intrínseca) ou resistência adquirida (transferência horizontal ou vertical) resulta em uma ineficiência destas drogas como tratamento de escolha para diferentes infecções.

Genes de resistência estão localizados sob elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons, gene cassete e ilhas genômicas, Estes genes de resistência a diferentes classes de antibióticos podem ser cotransferidos e coselecionados por uma variedade de bactérias incluindo a família Enterobacteriaceae e outros gêneros como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio* gerando assim microrganismos multiresistentes (Michel et al., 2006).

O abuso no uso de antibiótico na prática clínica, o tratamento de infecções causadas por organismos resistentes, a transferência e a disseminação de genes de resistência representam um problema de saúde pública e crucial importância a escolha de fármacos, especialmente em pacientes hospitalizados, e que estão sujeitos a grande pressão seletiva. O uso de novos agentes terapêuticos com amplo espectro deve ser evitado, para evitar disseminação de multiresistência em populações microbianas (Alanis, 2005).

Entre os microrganismos Gram positivos, ditos de primeira classe, em virtude da sua importância clínica, encontram-se *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *S. aureus* resistente a vancomicina e *Enterococcus* resistente a

vancomicina. Entre as bactérias Gram negativas multiresistentes estão *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*. O espectro de patógenos clínicos tem sido alterado nas últimas décadas onde cocos Gram positivos têm sido gradativamente dominados por bastonetes Gram negativos (Barret & Barret, 2003, Struelens et al., 2004, Fischbach & Walsh, 2009).

Sader et al. (2003) detectaram a predominância de basetes Gram negativos em amostras de pacientes com bacterímia nosocomial. Os microorganismos, *S. aureus*, *E. coli*, CONS e *K. pneumoniae* foram responsáveis por 21,3%, 17,2%, 13,9% e 9,2% dos casos respectivamente. Os resultados reportados neste trabalho demonstraram o aumento da resistência, principalmente a aminoglicosídeos e as cefalosporina de terceira geração por *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* e *Klebsiella pneumoniae*.

Alta taxa de resistência a cefalosporinas e monolactâmicos tem sido observado em *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e outros gêneros do grupo das Enterobacteriaceae. Tal resistência tem sido associada à produção de beta-lactamases de espectro estendido (Extended Spectrum Beta-Lactamase – ESBL). Estas enzimas representam um dos principais mecanismos de resistência pois promovem a hidrólise da ligação amida do anel lactâmico (Augusti et al., 2007, Sader et al., 2003, Fischbach & Walsh, 2009).

Da mesma forma, Lewis et al. (2000), em estudos realizados sobre a prevalência de bactérias isoladas de pacientes com pneumonia no período de

1997 a 2000, observaram a predominância de bastonetes Gram negativos como *P aeruginosa*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp, *Escherichia coli*, *Staplylococcus aureus* também foi reportado como um dos principais agentes.. Estes microrganismos representaram 80% dos isolados provenientes de 712 amostras. O estudo foi realizado com representação de cinco países da América Latina. *P.aeruginosa*, foi predominante, representando 26,8% dos isolados, seguido por *S. aureus* e *Klebisiella* com 24 e 12% respectivamente.

*Pseudomonas aeruginosa* é uma das bactérias Gram negativas mais comuns associadas a infecções nosocomiais, corresponde cerca de 20-25% dos casos sendo mais comumente isolada do trato respiratório. O aumento da resistência a ciprofloxacina, imipenem, tobramicina e aztreonam tem sido observado neste microrganismo (Gales et al., 2002, Obritsch et al., 2004).

*Klebsiella pneumoniae* tem sido reportada como um dos principais agentes de bacteremia, onde 44% tem sido adquirida na comunidade e 55% é nosocomial. Patterson et al. observaram que 30% das cepas que causaram bacterimia nosocomial foram produtoras de betalactamases (ESBL), e foram responsáveis por uma alta taxa de mortalidade nestes pacientes (24%) (Wagener & McCormack, 2004).

*Eschericia coli* é um patógeno conhecido por causar infecções intestinais, no entanto, tem sido observado que algumas linhagens apresentam um potencial para causar outras infecções como enterocolites, infecções no trato urinário, bacteremia, trato respiratório, peritonites, sepses. As chamadas EXPEC

(*E. coli* patógeno extraintestinal) adquiriram fatores de virulência causando infecções não intestinais, tanto em hospedeiros imunocomprometidos como em hospedeiros saudáveis. Cerca de 90% das infecções de trato urinário em mulheres pós-menopausa, são acarretadas por *E. coli*, assim como infecções abdominais, pneumonia, bacteriemias (17-37%) e sepse severa (Russo & Johnson, 2003).

Embora a maioria das infecções causadas por *Salmonella* sp. sejam assintomáticas ou limitada a diarreias, bacteremias ocorrem, mas em baixa frequência (2%). Este gênero apresenta duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, a espécie *S. enterica* é subdividida em seis diferentes subespécies que se diferenciam em 2400 sorotipos. O tratamento para salmonelose severa consiste no uso de ampicilina, cloranfenicol e trimetopim. No Brasil, predomina o sorotipo *S. Enteritidis* (Gales et al., 2002)

Entre as bactérias Gram positivas, *S. aureus* tem lugar de destaque em virtude da resistência e da severidade das infecções. Este microrganismo causa uma ampla variedade de doenças em humanos, desde furúnculos até a forma mais severa com septicemias, pneumonia e endocardites. É um patógeno versátil de humanos e outros animais e apresenta resistência a todas as classes de antibióticos. Vancomicina é o antibiótico de escolha para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes a metilina MRSA, no entanto algumas destas cepas adquiriram genes de resistência a vancomicina por transferência horizontal com *Enterococcus faecium* (Enright, 2003, Struelens et al.,

2004). Clones de *S. aureus* resistentes oxacilina tem se disseminado no Brasil, conforme demonstrado Lewis et al. (2000).

*Enterococcus* especialmente *E. faecium* e *E. faecalis*, são patógenos oportunistas e considerados um dos mais importantes microrganismos Gram positivos associados ao desenvolvimento de infecções nosocomiais, como infecções associadas ao trato urinário, endocárdio, sepse intrabdominal. Estes microrganismos são resistentes a uma ampla variedade de antibióticos empregados na terapia humana (Kak & Chow, 2002; Shepard & Gilmore, 2002, d'Azevedo et al., 2006, Macovei & Zurek L, 2007).

Embora seja relativamente recente o uso de vancomicina e teicoplanina, a resistência de microrganismos a estes antimicrobianos surgiu após um ano da introdução de oxazolidina, o que demonstra a rápida adaptação/seleção e disseminação de mecanismos de resistência se comparado com a velocidade de descoberta de novas moléculas bioativas (Gullo et al., 2006) .

Mais recentemente a daptomicina, linezolido e quinupristina têm sido empregados para tratamento por infecções causadas por *S. aureus* e *Enterococcus*, sendo a daptomicina mais efetiva no tratamento contra *Enterococcus* (Jevitt et al. 2003).

Fungos são importantes patógenos oportunistas, sendo responsável por infecções superficiais e invasivas. Entre os fungos filamentosos e leveduras de interesse clínico que causam micoses encontramos *Cryptococcus*, *C. albicans*, *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Cladosporium*, *Microsporium* responsáveis por 90 % das

infecções fúngicas em humanos e mais comumente isolados de ambiente hospitalar. Estes microrganismos são responsáveis por infecções invasivas e tem levado a morbidade e a mortalidade de inúmeros pacientes. Dos compostos antifúngicos disponíveis, e mais amplamente empregados, estão a anfotericina B e os azóis, apesar de eficientes, apresentam certa toxicidade (Andriole, 1999, Cowen et al., 2002, Gupte et al., 2002, Matta et al., 2007).

Nucci e Colombo (2006) observaram alta incidência de Candidemia em pacientes em unidades de tratamento intensivo, tendo *C. albicans* como a espécie mais freqüente, com 41,5% dos episódios reportados, seguido por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* com 20%. Mais recentemente tem sido observada a emergência de candidemia por espécies não-albicans, principalmente de *C. tropicalis* associada à pacientes com câncer. Os autores verificaram uma alta taxa de mortalidade de 62% devido a *C. albicans* e 59% *C. tropicalis*, acometendo pacientes de diferentes faixa etária

## **5.2 Microrganismos Fitopatogênicos**

Embora a maioria das plantas ao longo de sua evolução e coevolução com microrganismos, tenham desenvolvido vários mecanismos adaptativos e de defesa a diferentes patógenos, como produção de metabólitos e sistemas de bloqueio físico, muitas das plantas cultivadas são suscetíveis a uma ampla variedade de microrganismos.

Microrganismos fitopatógenos são responsáveis por causar uma inúmeras doenças como cancrios e sarnas, murcha, estiolamento, tombamento, podridão (raiz, flor), mancha e amarelecimento. Entre os principais agentes etiológicos estão fungos, bactérias e vírus, representando 70,5, 12,9 e 1,25% dos casos diagnosticados (Talmani et al., 2003).

Estes microrganismos são de grande importância agrícola e econômica, pois levam a redução na quantidade e na qualidade de diferentes cultivares como frutíferas, hortaliças, grãos, plantas ornamentais, forrageiras, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. A magnitude das perdas é dependente do tipo de cultura, do agente etiológico, da localidade e das medidas de controle empregadas. Entre os fitopatógenos de maior importância em relação a sua incidência/ocorrência, ao hospedeiro e distribuição estão os gêneros *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Colleotrichium*, *Alternaria*, *Phytophthora* e *Sclerotinia* entre os fungos e *Erwinia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Clavbacter*, *Xillela* e *Agrobacterium* entre as bactérias de importância agrícola (Gava et al., 2002, Talmani et al., 2003, Reis et al., 2005)

### **5.2.1 Fungos Fitopatogêncos**

O gênero *Fusarium oxysporum* é um fungo representativo da microbiota do solo, inclui espécies patogênicas e não patogênicas e apresenta uma grande diversidade sendo subdividido em subespécies e raças. A classificação se dá com base em características fenotípicas, genéticas e especificidade ao hospedeiro. Este fungo apresenta uma grande variedade de hospedeiros, representando 25 %

dos casos de doenças fúngicas em plantas. Das principais doenças encontra-se a murcha na cultura do tomate, arroz e soja. *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* é o agente etiológico da murcha em tomateiro (*Solanum lycopersicum* syn. *Lycopersicon esculentum*).

Doenças do trigo (*Triticum aestivum*) e da cevada (*Hordeum distichum*) em como principal agente etiológico o fungo *Bipolares sorokiniana*, que tem acarretado consideráveis perdas no rendimento e produção destes grãos. No trigo este fungo causa a mancha marrom ou helmintosporiose, na cevada está associado a podridão mole comum das raízes e manchas foliares. Ele sobrevive nos diferentes cereais de uma safra para outra, nas sementes e nos restos de cultura do trigo, centeio e cevada e os prejuízos com perdas econômicas representam 30% da produção (Kumar et al., 2001).

### **5.2.2 Bactérias fitopatogênicas**

De maneira geral, todas as fitobacterioses são de grande importância, pois, uma vez detectadas, comprometem a qualidade e a produtividade, Algumas são negligenciáveis em termos econômicos devido ao hospedeiro, ou a sua incidência esporádica, outras por sua vez são muito destrutivas acarretando a morte da planta e até mesmo inviabilizando o cultivo.

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* é o agente causal do cancro cítrico. No Brasil representa um problema fitopatológico grave. Este fitopatógeno surgiu por volta de 1950 em São Paulo e se disseminou nos diferentes estados



brasileiros e praticamente em todos os continentes. A doença manifesta-se por lesões salientes nas folhas e frutos. Em termos econômicos causa grandes prejuízos, devido a menor produção de citrus, tamanho reduzido dos frutos e mau aspecto o que compromete a sua exportação. Entre os cancrios, o cancro cítrico A é o mais difundido e a forma mais severa da doença (Graham et al., 2004)

O controle deste patógeno é de extrema importância uma vez que a citricultura brasileira é de grande impacto econômica e social no Brasil. Cerca de um milhão de hectares são empregados para o cultivo de frutas que supera 19 milhões de toneladas. O Brasil é o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja cujo valor das exportações desse e de outros derivados tem gerado cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais (EMBRAPA).

*Ralstonia solanacearum* é uma das bactérias mais agressivas em regiões tropicais, é responsável pela murcha das solanáceas. Este microrganismo permanece no solo por longos períodos não sendo conhecidas medidas para erradicá-la. Diferentes raças têm sido reportadas, cada qual com uma especificidade ao hospedeiro, entre os cultivares estão principalmente o tomate e a banana (*Musa* spp.) no Brasil e em outras regiões do mundo. Mais recentemente esta bactéria tem causado grandes perdas em viveiros de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), levando a mortalidade de 25% do cultivo (Alfenas et al., 2006)

Canela preta ou podridão mole dos tubérculos de batata tem sido causada por bactérias pertencentes ao gênero *Pectobacterium* (*P. carotovorum*

subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp *carotovorum* e *P. chrysantemi*). Recentemente, Duarte et al. (2004) caracterizaram e identificaram uma nova subespécie, que ocorre no Brasil, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (El Tassa et al.,2006).

Insumos químicos são extensivamente empregados na agricultura para evitar a incidência de fitopatógenos bem como reduzir os prejuízos, no entanto, estas práticas causam grandes problemas ao ambiente e a saúde humana .

Nos últimos anos, o controle biológico tem sido avaliado extensivamente e empregado como uma medida alternativa ao controle químico para reduzir o emprego de fungicidas, larvicidas, herbicida e o impacto destes sobre o ambiente e a saúde animal/humana. Diversas pesquisas têm mostrado o potencial de diferentes espécies de *Streptomyces* como biocontrole devido produção de antibiótico e enzimas hidrolíticas (quitinases, glucanas) com atividade contra uma ampla gama de fitopatógenos (Mahadevan & Crawford, 1997, Rifaat et al., 2007, Anitha & Rebbeth , 2009, Kang 2009, Khamna *et al.*, 2009, Koch & Loffler, 2009, Oskay , 2009)

## **6. Controle de microrganismo patogêncios**

### **6.1 Principais Antibióticos**

A classificação de antibacterianos é baseada na estrutura molecular e no seu mecanismo de ação. Os principais mecanismos de ação incluem a inibição

da síntese da parede celular e da membrana plasmática (beta lactâmicos e glicopeptídeos, lipopeptídeos), inibição da síntese de proteínas (aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, cloranfenicol, oxazolidinonas, estreptograminas, rifamicina) e de ácidos nucleicos (quinolonas). Atualmente, são reconhecidas dez classes de antibacterianos (Coutier, 1995, Fischbach & Walsh, 2009).

Membros de cada classe de antibiótico compartilham uma estrutura comum, como os beta-lactâmicos que apresentam um anel lactâmico em sua estrutura. Estes antibióticos atuam sobre a síntese do peptideoglicano, inibindo a ligação cruzada entre tetrapeptídeos (serina peptidases). Os glicopeptídeos que incluem os antibióticos vancomicina, teicoplanina, oxacilina e meticilina, atuam também sobre a síntese do peptideoglicano impedindo a ligação do dissacarídeo ácido acetilmurâmico e N-acetilglicosamina. Entre os lipopeptídeos empregados na terapia humana, está a daptomicina amplamente empregada no tratamento de infecções por cocos Gram positivos resistentes a meticilina e vancomicina. Este antibiótico se insere na membrana celular formando um canal que facilita o efluxo de potássio e outros íons levando a despolarização da membrana celular e a redução da síntese de macromoléculas (Coutier, 1995, Kern, 2006).

Aminoglicosídeos como a neomicina, gentamicina e kanamicina ligam-se ao sítio A da subunidade menor do ribossoma e inibem o reconhecimento tRNA. Macrolídeos como a eritromicina, inibem a síntese protéica na etapa peptil-transferase. As estreptograminas (quinupristina e dalfopristina) também inibem a síntese protéica, agem sinérgicamente, bloqueando a síntese do peptídeo em

formação. As tetraclinas, por sua vez inibem a síntese protéica por ligar-se reversivelmente a subunidade 30S (Diekema & Jones, 2000, Kotra et al., 2000, Chopra & Roberts, 2001, Gaynor & Mankin, 2005, Fischbach & Walsh, 2009).

Antibióticos antifúngicos também apresentam um número limitado, em relação a seu sítio alvo, cinco classes são conhecidas: os polienos, azoles, alilaminas e tiocarbamatos que atuam sobre o ergosterol presente na membrana e as morfolinás (equinocardinas) e nucleosídeos análogos (flupirimidina) inibidores de sintases como glucano sintases e inibidores da síntese de DNA respectivamente. Além da limitação em termos estruturais, estes compostos apresentam restrições ao uso devido a sua alta toxicidade e baixa especificidade. Dos antifúngicos mais amplamente empregados está a anfotericina B e compostos azoles. Anfotericina B interage com ergosterol acarretando no aumento da permeabilidade e celular, este composto tem um amplo espectro de atividade, tem efeito fungistático, e é a droga de escolha para diversas infecções como as causadas por *Cryptococcus*, *Sporotrichium*, *Candida*, *Fusarium*, *Blastomyces* entre outros. Compostos azoles inibem a biosíntese do ergosterol, na etapa de conversão de lanosterol a ergosterol, seu efeito é fungistático (Andriole, 1999, Cowen, et al., 2002, Gupte et al., 2002).

Embora atualmente existam centenas de antibióticos disponíveis no mercado, o seu uso é limitado principalmente na terapia humana devido a ineficiência dos antibióticos comumente empregados que promoveram uma pressão seletiva resultando na emergência e disseminação de microrganismos

resistentes/multiresistentes. Em virtude disso, a busca constante por moléculas que apresentem diferentes mecanismos de ação tem sido reportada. As proteínas FtsZ e MreB podem representar um novo sítio de ação para os quimioterápicos. Estas proteínas são amplamente distribuídas entre os microrganismos, são altamente conservadas e tem função primária nos processos de divisão celular e manutenção da estrutura celular. A FtsZ apresenta grande homologia estrutural com tubulinas, no entanto apresenta apenas 20% de similaridade (Vollmer et al., 2006, Gullo et al., 2006, Fischbach & Walsh, 2009)

É de suma importância pesquisas por novas moléculas bioativas e microrganismos produtores, políticas e práticas de controle e fiscalização, além de muita cautela para prescrever antibióticos efetivos contra o agente causal. Estas medidas visam reduzir a resistência a antibióticos e sua disseminação entre diferentes populações microbianas.

## **7. Atividade antimicrobiana de *Streptomyces***

Mais de 60 anos de pesquisa com *Streptomyces* reportam uma ampla variedade de moléculas bioativas incluindo compostos com atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiviral, antinematodeo, antiinseticida, inibidores enzimáticos, imunossupressores. Estudos de *screening* tem demonstrado potenciais produtores de novas moléculas bioativas. Diferentes espécies de *Streptomyces* produzem antibióticos pertencentes a diferentes classes como tetraciclina (*S. aureofaciens*, *S. rimosus*), estreptograminas, glicopeptídeos

(vancomicina, *S. orientalis*; teicoplanina, *S. teichomyceticus*), lipopeptídeos (daptomicina, *S. roseosporus*), cloranfenicol (*S. venezuelae*), macrolídeos (*S. erytreus*), aminoglicosídeos (kanamicina *S. kanamyceticus*), rinfamicina (*S. mediterrane*) (Kern, 2006, Shiomi et al., 2005, Li et al., 2005, Kang et al., 2009 )

Dos antibióticos mais recentemente introduzidos e constituindo um nova classe, está a daptomicina, um lipopeptídeo cíclico que apresenta com amplo espectro de atividade contra bactérias Gram positivas e tem demonstrado ser de 8 a 30 vezes mais efetiva que vancomicina e teicoplanina, especialmente contra MRSA e *E. faecalis* (Kern, 2006).

Outros compostos isolados de culturas de *Streptomyces* e que apresentam grande potencial *in vitro* contra bactérias Gram positivas incluem a platensicina, e a laidlomocina ativa contra cocos Gram positivos resistentes MRSA e VRE (Wang et al., 2006, Yoo et al., 2007).

Entre os antifúngicos promissores estão como a neopeptina produzida por *S. neopeptinius* sp. nov, ácido fenilacético e fenilacetato de sódio produzidos por *S. humidicus* (Hwang et al., 2001, Han et al., 2008).

Compostos como a mitramicina e cromomicina isolados de *S. argillaceus* e *S. griséus*, respectivamente, tem demonstrado o grande potencial como antitumorais (Lombo et al, 2006).

Espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* também produzem moléculas bioativas de amplo espectro de atividade antibacteriana e antifúngica como a kisinostatina produzida por *S. violaceusniger* e a munumbicina contra

patógenos de interesse clínico e fitopatógenos (Castilho et al., 2002, El-Naggar, 2006).

Ampla espectro de atividade antimicrobiana em virtude da produção de diferentes antibióticos tem sido relatado em diferentes espécies como observado em *S. subflavus* que produziu três compostos distintos, um destes irumamicina, (Fguira, 2005). Mehdi et al. (2006) reportaram a produção de múltiplos metabólitos antimicrobianos com atividade antibacteriana, antifúngica, antialérgica, antitumoral, herbicida e antiviral.

Embora possam produzir compostos com atividade antimicrobiana tem sido reportado outras aplicações para um mesmo composto, como foi verificado com o FK506 que foi identificado inicialmente como um composto antimicrobiano (antiviral) e mais tarde reportado seu potencial como imunossupressor (Reis et al., 2006).

Estudos recentes tem demonstrado que gênero *Streptomyces* representa ainda hoje uma fonte ilimitada de novas moléculas bioativas em virtude da evolução de múltiplos metabólitos secundários possivelmente por transferência horizontal (Chen et al., 2002; Challis & Hopwood, 2003).

O presente trabalho de pesquisa teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* provenientes de processo de compostagem frente a diferentes microrganismos (bactérias, fungos e vírus), incluindo microrganismos patogênicos e não patogênicos, de interesse clínico e agrícola. Um screening inicial foi realizado para selecionar potenciais produtores

de moléculas bioativas e estudos de produção foram realizados para avaliar as melhores condições para a produção destas. Neste estudo, dos 25 isolados empregados, dois foram caracterizados através de análises morfológicas, provas bioquímicas e análise parcial da região 16S do rDNA.

Os resultados obtidos neste trabalho serão apresentados na forma de três artigos científicos. No primeiro artigo, intitulado “In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* isolated from composting process” foi realizado um screening inicial para avaliar a atividade antimicrobiana de 25 isolados de *Streptomyces* contra 53 microrganismos incluindo bactérias Gram positivas, Gram negativas, leveduras e fungos filamentosos. A atividade antiviral contra Herpes vírus bovino tipo I também é reportada. Neste artigo, os 25 isolados de *Streptomyces* são caracterizados através de análises morfológicas e de biologia molecular, sendo que o isolado com maior espectro de ação, *Streptomyces* sp. 1S é identificado a partir de provas bioquímicas e da seqüência parcial da região 16S do rDNA. O segundo artigo, intitulado de “Evaluation of antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. producing antibiotic substances inhibitory to multiresistant Enterococci” reporta a atividade de *Streptomyces* contra dez cepas de *Enterococcus* multiresistentes provenientes de amostras clínicas e de alimentos. Uma caracterização parcial dos compostos com atividade antimicrobiana foi realizada através da extração das culturas filtradas com solvente orgânico e por cromatografia de camada delgada. A concentração inibitória mínima do extrato provenientes do cultivo de um dos isolados de *Streptomyces* foi determinada pelo método de microdiluição. O isolado



*Streptomyces* sp. 50 foi caracterizado. No terceiro e último artigo, “Estudo de Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp . 1S, foram avaliadas diferentes condições de cultivo (meio de cultura , temperatura e tempo de incubação) para verificar as melhores condições para a produção de moléculas bioativas produzidas pelo isolado 1S contra os diferentes microrganismos teste.

## **ARTIGO 1**

**Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from composting process and their antimicrobial potential**

(Aceito para publicação na revista World Journal of Microbiology and Biotechnology)

Salamoni, Sabrina Pinto<sup>1</sup>, Michele B. Mann<sup>1</sup>, Fabrício S. Campos<sup>2</sup>, Ana Claudia Franco<sup>2</sup>, José C. Germani<sup>3</sup> and Sueli T. Van Der Sand<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>2</sup>*Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>3</sup>*Laboratório de Tecnologia Bioquímica, Departamento de Produção de Matéria Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

**Corresponding author:** Sueli T. Van Der Sand, PhD, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, sala 158, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: [svands@ufrgs.br](mailto:svands@ufrgs.br)

**Abstract**

The aim of this study was to screen *Streptomyces* isolates with antimicrobial and antiviral activity, in a search for new metabolites. The isolates were obtained from a composting process, and identified based on morphological characteristics and molecular biology methods. The antimicrobial activity was determined using the double-layer agar method against 53 test organisms (bacteria, yeasts, and filamentous fungi). All isolates were grown in submerged culture, in mineral salts-starch-casein (SC) broth and ISP2 media, and the filtrate cultures were used in the assays for antibacterial and antiviral activity. Bovine Herpes virus (BoHV-1) was used for the antiviral activity. The morphological and molecular characteristics confirmed that all 25 isolates belonged to the genus *Streptomyces*. In the assay for antimicrobial activity, 80% of the *Streptomyces* isolates were able to inhibit at least one of the test organisms. Of these, 80% were active against bacteria and 45% against fungi. Eight of the isolates showed a broad spectrum of inhibitory activity; of these, the isolate *Streptomyces* spp. 1S was able to inhibit 46 of the test organisms, and, most importantly, the 16 Gram-negative strains were inhibited. Of the 25 isolates, 44.4% of the isolates were able to grow and produce bioactive metabolites when grown in submerged culture. Four extracts showed a cytopathic effect in 10 CCID<sub>50</sub> MDBK cell, even though no viricidal effect was observed. The results obtained with these isolates indicated good biotechnological potential of these *Streptomyces* strains.

**Key words:** *Streptomyces*, antimicrobial, antiviral, secondary metabolites

**Introduction**

The genus *Streptomyces* was proposed by Waksman & Henrici, 1943, and classified on the basis of morphological and cell-wall chemotaxonomic characters in the family Streptomycetaceae. They are aerobic, Gram-positive bacteria that have high DNA G-C% content, contain LL-diaminopimelic acid, and lack sugars in the cell wall (cell-wall type I), according to Lechevalier & Lechevalier (1967). They produce a substrate mycelium and extensively branched aerial hyphae. Characteristic long chains of arthrospores are formed in the aerial mycelia at a mature stage of their life cycle (Anderson and Wellington 2001; Williams et al. 1983).

*Streptomyces* species are generally saprophytic, soil-dwelling microorganisms that spend the majority of their life cycle as spores. They are rich sources of many natural products with biological activity, notably antimicrobials, enzymes, enzyme inhibitors, toxins, antitumor agents, immunomodulator agents, growth promoters of plants and animals, and antiviral compounds (Basilio et al. 2003; Li et al. 2008; Thakur et al. 2007).

Chemotaxonomic and molecular methods are now used together with numerical taxonomic methods to improve our understanding of species relationships within the genus *Streptomyces*. These methods include analysis of the cell-wall composition, DNA±DNA hybridization, ELISA, low-frequency restriction fragment analysis, and comparisons of 16S rRNA and 23S rRNA sequences (Lechevalier and Lechevalier 1967; Stackebrandt et al. 1991b). The  $\gamma$

variable region of 16S rDNA has been used to resolve inter- and- intraspecies relationships within the Streptomycetes (Anderson and Wellington 2001).

Since the discovery of actinomycin, actinomycetes have provided many important bioactive compounds of high commercial value, and continue to be routinely screened for new bioactive substances. Approximately two-thirds of the thousands of naturally occurring antibiotics have been isolated from these organisms, and about 75% are produced by members of the genus *Streptomyces* (Basilio et al. 2003).

Despite the long list of currently available antibiotics and their applications, the increase in the resistance of human-pathogen populations to these compounds is of primary concern to the medical community and pharmaceutical industry, and the problem is particularly severe in hospitals. The use of antibiotics inevitably selects for resistant microbes, so there is a continuing and cyclical need for new antibiotics. An antibiotic's useful lifetime begins to diminish before clinically significant resistance emerges, impelling the need for new drugs to combat the current generation of resistant pathogens. Therefore, new sources and strategies are required to find antimicrobial agents that combine a broad spectrum of activity with resistance to inactivation by bacterial enzymes. Recent reports show that species of *Streptomyces* still remain an important source of antibiotics, with applications in medicine, veterinary medicine, and agriculture (El-Naggar et al. 2006; Shiomi et al. 2005). Most of the work of screening new antibiotics has been done using a very limited number of test microorganisms, including

*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Candida albicans* (Barakate et al. 2002; Ilic et al. 2007; Saadoun and Gharaibeh 2003; Thakur et al. 2007). In an effort to broaden the scope of the search for new antibiotics, the main objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates against 53 microorganisms, including bacteria, yeasts, and filamentous fungi, pathogenic and non-pathogenic to humans, animals, and plants, as well as viruses; and to select potential isolates for further studies of production, purification, and characterization of bioactive compounds.

## **Material and methods**

### Isolates

For this study, 25 *Streptomyces* isolates were used. The strains were previously isolated from composting domestic residue on mineral salts-starch-casein-agar (SCA) medium (10.0 g starch, 0.3 g casein, 2.0 g  $K_2HPO_4$ , 2.0 g NaCl, 2.0 g  $KNO_3$ , 0.05 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01 g  $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$ , 15.0 g agar). The isolates were recognized on the basis of morphological features of the colonies (Williams et al. 1983). The colonies with the color and characteristics of *Streptomyces* were further purified, and representative cultures were preserved in our culture collection. The isolates were recovered in starch-casein (SC) broth. An aliquot of the preserved culture was inoculated in 5 mL of SC and incubated at 37 °C for 10 days. After growth, cultures were seeded on SCA medium and incubation took place as

before. Those colonies that showed a *Streptomyces*-like appearance were identified using morphological characteristics (Shirling and Gottlieb 1966 ; Williams, et al. 1971).

#### Characterization of the isolates

The strains were characterized morphologically and physiologically, following the directions given by the International *Streptomyces* Project (ISP) (Shirling and Gottlieb 1966; 1972; Williams et al. 1983). The morphology of aerial hyphae and substrate mycelia and spore chains was determined by direct light-microscopy examination of cultures after 10 days of growth at 30 °C ( Williams et al. 1971). The strains were grown on yeast extract-malt extract agar (ISP2) (Shirling and Gottlieb 1966) and SCA following directions given in the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams et al. 1983). The color determinations of the aerial mass, substrate mycelium (reverse color), and pigment production were examined in ISP2, inorganic salt-starch agar (ISP4), and glycerol-asparagine agar (ISP5) respectively (Shirling and Gottlieb 1966).

#### Molecular identification of the isolates

In order to confirm the morphological identification of the isolates, genomic DNA was extracted and one pair of primers used for amplification of the 16S rDNA fragment. The amplification was done using a pair of primers designed by Rintala

et al. (2001) which are specific for the genus *Streptomyces* Strep B (5' ACAAGCCCTGGAAACGGGGT 3') and Strep F (5'ACGTGTGCAGCCCAAGACA 3'). The PCR reactions were carried out in 0.2 ml tubes in a total volume of 25  $\mu$ l. The mixture contained 1X reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq polymerase, 0.2  $\mu$ M of each primer, 0.3 mM deoxynucleotide, and 20 ng DNA. The amplification conditions were: initial denaturing for 5 min at 94°C, 35 cycles: 1 min at 94°C; 1 min at 58°C, and 2 min at 72°C, with a final extension at 72°C for 10 min. The reaction products were analyzed by electrophoresis for 45 min at 75 V in 0.8% agarose.

#### Restriction digests of amplified products

For the confirmation of the the genus *Streptomyces* the amplification products from the Strep B and Strep F primers from all isoates were digested with the restriction enzyme *Xho*II (isoschizomer of *Bst*YI) as proposed by Rintala et al (2001). The reactions were prepared following the manufacturer's instructions individually for each enzyme. All reactions were repeated twice. The reaction products were analyzed by electrophoresis for 1 h 30 min at 75V in 1.5% agarose.

#### Biochemical and physiological characterization of strain 1S

For the biochemical and physiological studies of strain 1S, 36 tests were applied, including the utilization of 14 carbohydrate compounds evaluated on basal carbon



medium (ISP 9), the utilization of seven nitrogen sources, the degradation of organic compounds: milk casein, cellulose, Tween 80, gelatin, starch, esculin, urea, H<sub>2</sub>S production, production of melanoid pigments and diffusible pigments on ISP1 medium, and nitrate reductase (Gottlieb 1961). The strain was also examined for its ability to grow on medium supplemented with sodium chloride at concentrations of 4%, 7%, 10%, and 13% and at temperatures of 20, 37, and 45°C. All cultures were incubated at 28± 2°C for 10 days, except for gelatin liquefaction (21 days). The morphology of the spores was examined by electron microscopy.

#### Genetic characterization of strain 1S

The 16S rDNA of strain 1S was partially amplified using two primers, forward A (5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG'3) and reverse H (5' AGGAGGTGATCCAGCCGCAC 3') designed by Edwards et al. (1989). The amplification was carried out in 0.2 ml tubes in a total volume of 50 µl. The mixture contained 1X reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq polymerase, 0.2 µM of each primer, 0.3 mM deoxynucleoside, and 20 ng DNA. The amplification conditions were: initial denaturing for 5 min at 94°C, 35 cycles: 1 min at 94°C; 1 min at 58°C, and 2 min at 72°C; with a final extension at 72°C for 10 min. The PCR product was detected by agarose gel electrophoresis and was visualized by ultraviolet (UV) fluorescence after ethidium bromide staining.

The sequencing reaction was performed by the Molecular Biology Laboratory (UFCSPA- Porto Alegre) using the same primers as before and an

automated sequencer was used for this purpose. The sequence obtained was compared with the reference species of *Streptomyces* obtained from the genomic database EMBL/GenBank database, using NCBI BLAST.

#### Antimicrobial activity evaluation

The antimicrobial activity of the isolates was determined using the double-layer agar method. *Streptomyces* isolates were inoculated, by the spot inoculation method, onto Petri dishes with SCA medium, and incubated at 30 °C for 14 days. Each plate was inoculated with four different isolates of *Streptomyces*, and three plates were prepared for each test microorganism. The bacteria and yeast strains to be tested were grown on trypticase soy broth (TSB) until the concentration of  $10^9$  cells/mL was reached. One milliliter (1 mL) of each bacteria culture was mixed with 9 mL of Mueller-Hinton agar and poured over the layer with *Streptomyces* grown on Petri dishes. The same procedure was performed with 1 mL of yeast on potato dextrose agar (PDA) medium. After the inoculation, the plates were incubated for 24-72 h at 37°C for bacteria and 28°C for yeasts. After the incubation period, the inhibition haloes were observed. The filamentous fungi to be tested were grown on dishes with Sabouraud agar and incubated at 28°C for ten days. One aliquot of 2 mL of Sabouraud broth was laid over the colonies, and spores were dispersed with a Drigalsky loop. Aliquots of the spore suspension were transferred into 10 mL Sabouraud broth, and dilutions were prepared until a

concentration of  $10^6$  spores/mL was obtained. 1 mL of the suspension was added to 9 mL of Sabouraud agar and poured onto the dishes with the *Streptomyces* growth. The plates were incubated at 30°C for 7 days. After the incubation period, the inhibition haloes were observed.

### Submerged cultures

*Streptomyces* isolates were grown in submerged culture in 250 mL flasks containing 50 mL of SC broth and ISP2 (Shirling and Gottlieb 1966) culture medium. Inoculation was performed with a 10% culture grown for 48 h, of each isolate. These cultures were grown in a rotary shaker at 150 rpm at 30°C for seven days. Each of the resulting culture broths (approximately 50 mL) obtained following the growth of each isolate in each culture medium was separated from the mycelium by centrifugation. The supernatant, sterilized by filtration, was used for assessment of the extracellular antimicrobial activity by the agar-well diffusion method against test microorganisms and the antiviral test. The crude antimicrobial compound was recovered from the culture filtrate of each active isolate by solvent extraction with ethyl acetate. Ethyl acetate was added to the filtrate in the ratio 1:2 (v/v) and shaken vigorously for 30 min. The extraction was repeated three times. The organic layers were collected, and the organic solvent was evaporated to dryness in a vacuum evaporator at 40°C to obtain a gummy crude extract.

### Antibacterial activity of the filtrate

For the evaluation of the antimicrobial activity of the filtrate, the test organisms used were Gram-positive (nine strains) and Gram-negative bacteria (seven strains). By means of a sterile cork borer, wells were punctured in plates containing Muller-Hinton agar previously seeded with one of the test organisms. One hundred microliters (100  $\mu$ L) of supernatant of each isolate was added in each well. The Petri dishes were incubated at 8-10°C for 16 h for the diffusion of the bioactive compound. After that, the incubation continued at 37°C for 24 h. After incubation, inhibition zones were measured. Assays were carried out in triplicate.

### Cytotoxic and antiviral activity

Tests were performed using bovine kidney cells (*Madin-Darbyn bovine kidney* – MDBK) for the multiplication of bovine herpesvirus type I (BoHV-I), and for the cytotoxic and antiviral tests. Cells were cultured in Eagle minimal essential medium (E-MEM), supplemented with 10% fetal calf serum, 2.5  $\mu$ g of amphotericin B, and 10  $\mu$ g of enrofloxacin. The BoHV-I sample used was EVI 123/98, isolated in the state of Rio Grande do Sul in southern Brazil (D'Arce et al. 2002). The cytotoxic assays were performed by incubating the samples in duplicate onto MDBK cell monolayers cultured in 96-well microplates. Serial dilutions on Log<sub>2</sub> up to 1:64 of

the crude extract and the organic fraction were prepared, and 50  $\mu\text{L}$  of each dilution was added to the cell monolayer in the microplates. Plates were incubated at 37°C for 24-72 h. The morphological alterations of the treated cells were observed by means of an inverted optical microscope. The lowest dilution of the organic fraction or the crude extract that did not cause visible morphological cell changes was designated the minimum non-toxic dilution (Miranda et al. 1997). To detect a possible antiviral effect of the samples, MDBK cells were infected with 100 and 50% cell-culture infective doses (CCID<sub>50</sub>). Next, 50  $\mu\text{L}$  of *Streptomyces* extract was added to the infected cells in duplicate. Microplates were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 96 h. During this period, the cells were observed using an inverted optical microscope, for any characteristic sign of cytopathic effect. The complete inhibition of the cytopathic effect in the presence of a minimal 10 CCID<sub>50</sub> was considered as an antiviral activity. Virus titers (CCID<sub>50</sub>) were calculated by the Reed & Muench (1938) statistical method. Cells and virus controls were included in all assays.

Table 1: Test organisms, used in the antimicrobial assay and percentage of *Streptomyces* isolates that showed antimicrobial activity, using the double layer method.

Gram positive bacteria	%	Gram negative bacteria	%
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33019	32%	<i>Escherichia coli</i> rough	12%
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	72%	<i>Escherichia coli</i> LT <sup>+</sup>	4%
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	40%	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	4%
<i>Enterococcus faecium</i>	20%	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	4%
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	16%	<i>Enterobacter agglomerans</i>	28%

<i>Lactobacillus plantanarum</i> ATCC 4356	36%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	4%
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	36%	<i>Pectobacterium brasiliensis</i> **	4%
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 1644	32%	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	4%
<i>Listeria monocytogenes</i>	16%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15422	8%
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	36%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8%
<i>Paenibacillus alvei</i> ATCC 6344	485	<i>Ralstonia solanacearum</i> **	4%
<i>Paenibacillus polimyxa</i> ATCC 842	32%	<i>Salmonella cholerasius</i> ATCC 13076	4%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	40%	<i>Salmonella Eteretides</i> SE 86 <sup>†</sup>	4%
<i>Staphylococcus aureus</i> INCQS 00387	40%	<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	28%
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 33591	16%	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> **	44%
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 17153	36%	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> **	4%
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 8668	36%		
<i>Alternaria solani</i>	4%	<i>Microsporus gypseum</i> *	-
<i>Bipolaris oryzae</i>	4%	<i>Penicillium verruculosum</i>	8%
<i>Bipolaris sorokiniana</i> 98017	4%	<i>Penicillium thomii</i>	12%
<i>B. sorokiniana</i> 98022	4%	<i>Rizoctonia</i>	-
<i>Gerlachia</i>	8%	<i>Sporotrix schenkii</i> 201679	12%
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> 46422	4%	<i>Tricophyton interdigitalis</i> 87	8%
<i>Fusarium oxysporium</i>	4%	<i>T. mentagrophytes</i>	8%
		<i>Verticillium alboatrum</i>	4%
<b>Yeasts</b>			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	16%	<i>Candida tropicalis</i>	4%
<i>Candida albicans</i>	4%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12%
<i>Candida glabrata</i>	-		

ATCC- American Type Culture Collection; INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil); #Sample from the Instituto de Ciências e Tecnologia dos Alimentos – ICTA/UFRGS, \*\*Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia (UFRGS), \*Mycology laboratory collection ICBS/UFRGS. All other samples are from our own laboratory collection.

## Results

The isolates were identified as species belonging to the genus *Streptomyces* by analyzing their morphological characteristics. The isolates were identified to genus level by comparing the morphology spore chain as described in Bergey's Manual (Table 2). In order to determine their taxonomic status, more detailed characterization studies were carried out. Some of the cultural characteristics of the strains are given in Table 2.

Table 2: Cultural characteristics of the *Streptomyces* isolates

Isolates	Aerial mycelium			Substrate mycelium		Melanin (ISP1)	Soluble pigment	Microculture (mycelium)
	ISP2	ISP4	ISP5	ISP2	ISP5			
1S	W	G	W	W	R	absent	R	S
2S	G	G	W	G	R	absent	R	S
3S	G	G	G	Br	W	absent	absent	F
6E	G	G	G	W	G	absent	absent	S
6S	G	G	G	G	R	absent	R	S
8E	G	G	G	W	Y	absent	absent	RA

8S	G	G	G	Br	G	absent	absent	S
23	NG	W	NG	B	B	absent	absent	F
28	G	G	W	Br	W	absent	absent	RA
29	G	NG	G	W	G	absent	absent	F
31	W	NG	Y	W	W	absent	absent	ND
34	W/G	G	G	B	W	absent	absent	S
36	Gr	Gr	Gr	Gr	Gr	absent	absent	S
37	G	G	Y	G	B	absent	absent	ND
43	G	NG	G	R	R	absent	R	S
47	G	G	G	W	G	absent	absent	F
48	G	G	G	G	G	absent	absent	S
50	G	G	G	W	G	absent	absent	RA
77	Gr	Gr	Gr/ G	Gr	Gr	absent	absent	S
83	Gr	Gr	Gr	Gr	Gr	absent	absent	S
84	Gr	G	Gr	Gr	Gr	absent	absent	S
95	G	G	G	G	Gr	absent	absent	S
103	Y	W	Y	Y	Y	absent	absent	F
107	Y	W	Y	Y	Y	absent	absent	ND
AP	G	G	G	R	R	absent	R	S

---



S: spiral; F: flexous; RA: retinaculiaperti; ND: not determined; NG: no growth; G: gray; Y: yellow; R: red, W: white; B: beige; Br: brown; Gr: green

The 25 isolates, when submitted to amplification with the Strep B and Strep F primers, yielded a product with a molecular weight around 1074 bp, The amplified products of all isolates after digestion with the restriction enzyme *Xho*II generated two fragments of approximately 567bp and 507bp as expected for *Streptomyces* sp. isolates ( Figure 1).

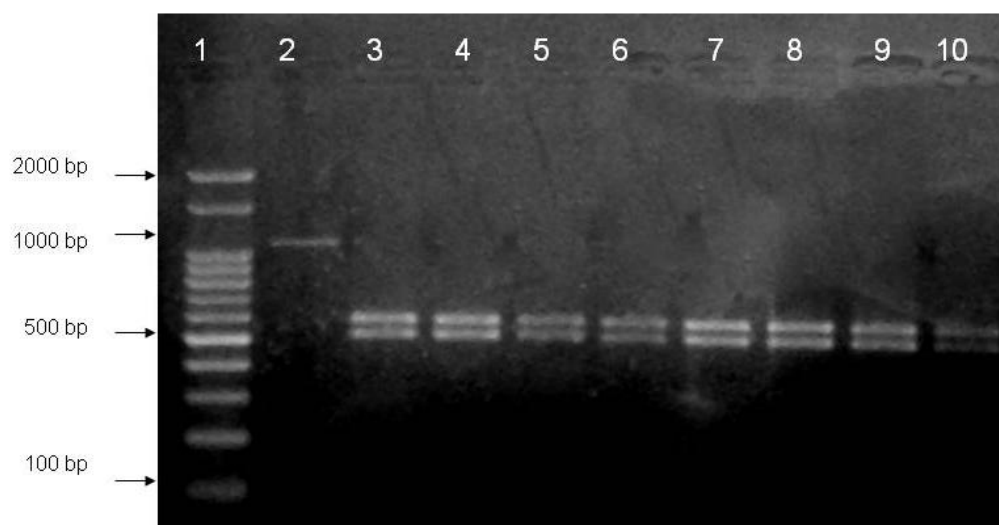


Figure 1. Amplification products obtained with primers StreB/StrepF digested with *Xho*II restriction enzyme. (1) Molecular marker Ladder 100bp, (2) *Streptomyces rochei* – positive control, (3) isolate 1S, (4) isolate 2S, (5) isolate 8S, (6) isolate 28, (7) isolate 37, (8) isolate 48, (9) isolate 50 e (10) isolate 77. \*

In this study, 25 *Streptomyces* isolates were screened against 53 test organisms, including bacteria, yeasts, and filamentous fungi, searching for

bioactivity of the *Streptomyces* isolates against these strains. Eighty percent of the isolates were active against one or more of the test organisms. Of these, 90% (18) showed activity against bacteria, 45% (9) against fungi, and 35% (7) of the isolates showed activity against both bacteria and fungi. Of the *Streptomyces* isolates that showed antibacterial activity, all of them inhibited the growth of Gram-positive bacteria, and 55.6% inhibited Gram-negative bacteria.

The percentage of *Streptomyces* isolates that inhibited Gram-positive bacteria varied from 8 to 68% and a much lower percentage, 4 to 44%, were able to inhibit Gram-negative bacteria. Of the 16 Gram-negative bacteria tested, 10 were inhibited by only one isolate. Antifungal activity was detected in 36% of the *Streptomyces* isolates. C.

Of the isolates that showed antimicrobial activity, eight (40%) showed a wide spectrum of antibacterial activity. On the other hand, only one isolate showed a wide spectrum against fungi (Table 3). One isolate *Streptomyces* spp. 1S, showed a broad spectrum of activity, inhibiting 46 strains of the 53 test organisms used in this study, including bacteria and fungi. Each *Streptomyces* isolate showed a particular spectrum of antimicrobial activity. These results indicated the high physiological and metabolic diversity of these isolates.

Table 3. *Streptomyces* isolates that showed a broad spectrum of activity in the antimicrobial assay against 53 test organisms.

Isolates	Gram-positive bacteria (n=17)	Gram- negative bacteria (n=16)	Yeasts (n=5)	Filamentous fungi (n=15)	Test organisms inhibited
1S	14	16	4	12	46
2S	16	5	0	0	21
3S	16	3	1	0	20
29	11	1	0	0	12
48	17	3	0	0	20
50	17	2	0	0	19
8S	15	3	0	0	18
AP	16	3	0	1	20

The 18 isolates that produced antibacterial metabolites were fermented in two different liquid media: ISP2 and SC broth. Only eight isolates were able to grow in liquid media and showed antibacterial activity. The others, grew in liquid culture, but were unable to produce bioactive metabolites. SC broth seems to be the most favorable medium for development and antibiotic production for most of this isolates, even though for isolate 1S the the best results were obtained in ISP2

medium (Table 4). Isolates 48 and 50, when grown on SC medium, showed the best haloes among all the isolates. This two isolates showed a very good activity against *Enterococcus hirae*, *S. aureus* (MRSA) and *S. galactiae*. However, isolate 1S, when grown in ISP2 medium, was able to inhibit all Gram negative strains tested in this assay, and most of the Gram positive bacteria (Table 4). So, due to the promising results obtained in the first screening and in submerged culture *Streptomyces* sp. 1S strain was selected for taxonomic study. Microscopic examination of the selected isolate revealed that aerial mycelia produced branched spiral spore chains with hairy surfaces (Figure 2). The spore mass was gray and the reverse red. A soluble red pigment was produced in all media used.

Table 4. Isolates that grew in SC and ISP2 media, in submerge culture condition, and showed inhibitory activity against test bacteria. The inhibition zone was measured and determined by the media of the repetitions.

Culture media	SC/ISP2							
<i>Streptomyces</i> isolates	1S	2S	3S	8S	48	50	83	AP
Test organisms	Inhibition Zone (mm)							
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	NI/14	33/30	34/NI	15/NI	38/ 39	35/ 35	12/NI	17/ NI
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659	NI/21	13/26	15/NI	NI/NI	15/ NI	15/NI	NI/NI	22/ NI
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	NI/NI	29/NI	24/NI	25/NI	29/27	27/31	NI/NI	21/ NI
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1644	NI/15	13/NI	NI/17	NI/NI	22/NI	21/NI	NI/NI	21/ NI
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12/25	20/29	26/NI	20/NI	21/NI	25/NI	NI/NI	22/ NI
<i>S. pyogenes</i> ATCC 8668	NI/19	23/25	NI/NI	NI/NI	22/NI	25/NI	NI/NI	21/ NI
<i>S. agalactiae</i> ATCC 17153	NI/NI	21/19	24/NI	19/NI	20/33	13/34	NI/NI	21/ NI

<i>S. aureus</i> -MRSA	NI/11	16/17	25/NI	26/NI	29/29	29/NI	NI/NI	22/ NI
<i>P. polimyxia</i> ATCC 842	11/13	24/19	27/NI	NI/NI	26/NI	25/NI	NI/NI	14/ NI
<i>S. Enteretidis</i> SE 86	NI/15	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/NI	24/NI
<i>R. solanacearum</i>	NI/14	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/NI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	NI/11	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/ NI	NI/NI	NI/NI
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	NI/13	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/NI	NI/ NI	NI/NI	NI/NI
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15422	NI/11	15/NI	NI/NI	NI NI	NI/NI	NI/ NI	NI/NI	NI/NI
<i>X. axonopodis</i> pv <i>Citri</i>	NI/20	27/NI	17/NI	24/ NI	29/NI	32/ NI	NI/NI	23/11

NI: no inhibiton activity

For the physiological studies 36 tests were considered. Isolate 1S was able to use L-arabinose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-lactose, D-mannose, cellobiose, D-maltose, L-rhamnose, D-xylose, D-salicin, mesoinositol, threalose, D-mannitol, D-raffinose, as sole carbon sources but did not use adonitol. As nitrogen sources arginine, histidine, serine, threonine and valine was used and did not use phenylalanine and methionine. Extracellular enzymes production it was observed cellulase, lipase, tween 80, gelatin liquefaction and the H<sub>2</sub>S production however, it has a negative response for esculin and starch hydrolysis, milk coagulation, nitrate reduction and urease production. This isolate grow in a range of temperature from 20 – 37 °C and a weak growth occurs in the presence of 7, 10 and 13% (w/v) NaCl.



Figure 2. Morphological characteristics of *Streptomyces* 1S under scanning microscope.

The partial 16S rDNA sequence (641 nucleotides) of strain 1S was determined. The sequence obtained was aligned with all available *Streptomyces* references available in the GenBank database. The results confirmed that strain 1S belongs to the genus *Streptomyces*. Analyses based on 16S rDNA sequence similarities showed that strain 1S shows 96% similarity with *Streptomyces diastaticus*. The physiological properties that distinguished strain 1S from the strain *S. diastaticus* are summarized in Table 5.

In the assay for antiviral activity, only four crude extracts were able to inhibit the appearance of a cytopathic effect caused by the growth of BoHV-1 in MDBK cells. Two of these extracts were obtained from the growth of isolates on SC broth, and the other two from growth in ISP2 medium. One isolate grown on SC was able

to inhibit the cytopathic effect with 10 and 100 CCID<sub>50</sub>, and the other three isolates showed an inhibitory effect only with 10 CCID<sub>50</sub>. However, a viricidal effect was not observed, as tested by incubation with serial dilutions of the virus and the crude extracts of these bacteria incubated before being overlaid on cell monolayers (data not shown).

Table 5. Physiological characteristics that distinguish strain 1S from the most closely related species.

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>S. diastaticus</i>
	1S Spiral	Spiral-rectin flexuous
Production of melanoid pigment	-	+
Diffusible red pigment	+	-
<b>Degradation activity</b>		
Starch	-	-
Casein	-	+
Esculin	-	+
Gelatin	-	+
<b>Growth at:</b>		
NaCl 7%	+	-
NaCl 10%	+	-
NaCl 13%	+	-
Histidine	+	-
Valine	+	-
Nitrate reduction	-	+
Urease	-	+

## Discussion

On the basis of their morphological and chemical properties, the 25 isolates from this study were classified in the genus *Streptomyces*. The characterization of *Streptomyces* species is mainly based on the color of aerial and substrate mycelia, the soluble pigment, and the shape and ornamentation of the spore surface, because of their stability (Shirling and Gottlieb 1966; Williams et al. 1983). Since phenotypic properties often provide insufficient taxonomic resolution at species level, synonymies among species names exist. The classification of streptomycetes has become clearer since the application of genotypic approaches, but in practical terms, the large number of validly described species in the genus remains the main obstacle in *Streptomyces* taxonomy. For the genus confirmation of all isolates primers Strep B/ Strep F associated with the restriction enzyme *Bst*YI was used. In this work the enzyme *Xho*II (an isoschizomer of *Bst*YI), was used instead and the results confirmed a pattern of two fragments (567 and 507bp) for all 25 isolates as described by Rintala et al (2001).

It has been estimated that the genus *Streptomyces* might produce at least 1,000,000 new compounds of biological interest (Watve et al. 2001). Screening, isolation, and characterization of promising strains of actinomycetes producing potential antibiotics has been a major area of research of many groups for many years (Forar et al. 2006; Forar et al. 2007; Hâcene et al. 2000). A very wide variation in the percentages of active isolates and activity spectra has been observed. These variations result from the great metabolic diversity of these



isolates and the methodology used for the screening activity. In this study, antimicrobial activity was observed in 80% of the isolates. Similar results have been obtained by different authors, and the numbers of isolates with antimicrobial activity ranged from 45.9 to 96% of the isolates (Ndonde and Semu 2000; Sahin and Ugur 2003).

In this study, 40% of the isolates were able to inhibit Gram-negative bacteria, among them *Pseudomonas* spp. and *E. coli*. These two strains are usually among the test organisms used in screening projects, and are the least susceptible to different kinds of metabolites (Barakate et al. 2002; Basilio et al. 2003). In this study, the *Streptomyces* isolates showed a low spectrum of activity against Gram-negative bacteria. Only strain, *Streptomyces* 1S, showed a broad activity spectrum, inhibiting all the Gram-negative test organisms.

It has been reported by many workers that *Streptomyces* isolates show a higher antibacterial than antifungal activity. These results might result from the higher frequency of use of bacteria as test organisms than of fungi. Basilio et al. (2003) detected antibacterial and antifungal activity in 67% and 52% of isolates tested, respectively: on the other hand, Kitoumi et al. (2005) observed a very low number of isolates with bioactive metabolites: only 8% of the isolates showed activity against fungi. In our work, 36% of the isolates inhibited the test fungi, which is a promising result.

The active isolates, when subjected to submerged culture, showed different activity from that found in the primary screening in agar medium. Of the 18 active

antibacterial isolates, only 44.5% of the isolates were active in liquid media. For all selected isolates, the antimicrobial activity was more significant in solid than in liquid media. It has been established that solid medium is more appropriate for the development of isolates and the production of antibiotics (Iwai and Omura 1982; Badji et al. 2005). Similar results with submerged cultures were observed by other authors (Ilic et al. 2007; Aniboun et al. 2008; Thakur et al. 2007).

Besides their antibacterial and antifungal activities, the crude extracts of four isolates also showed antiviral activity at non-toxic dilutions. These results indicate that the bioactive compounds were not able to directly inactivate the virus particles, which would lead to an impairment of the first steps of virus multiplication, such as adsorption and/or penetration. Similar results were found in previous studies of the antiviral activity of purified *Streptomyces* metabolite (Sacramento et al. 2004). An inhibitory effect on the replication of human herpesvirus type 1 (HHV-1) and of type A influenza virus was also observed in a previous study on the production and activity of proteolytic inhibitors isolated from different strains of *Streptomyces* (Serkedjieva and Ivanova 1997).

The genus *Streptomyces* shows great morphological, physiological, metabolic, and genetic diversity. This diversity can also be observed in the diverse array of antibiotics, including aminoglycosides, macrolides,  $\beta$ -lactams, peptides, polyenes, polyether, and tetracyclines produced by these microorganisms. The broad spectrum of activity detected in some of the *Streptomyces* isolates in this study could be due to different antimicrobial compounds produced by the isolates,

each one with a species- or group-specific activity, as previously reported by Wang et al. (2006); and/or to the presence of more than one compound with a broad spectrum of action, such as the antibiotic daptomycin, which is able to inhibit different Gram-positive bacteria (Kern 2006), and meroparamycin, which is active against Gram-positive bacteria, yeasts, and filamentous fungi (El-Naggar 2006), among others.

The *Streptomyces* isolates in this study showed 20 different patterns of activity. This means that each isolate has its own spectrum of antimicrobial activity, again demonstrating the physiological and morphological diversity of these isolates. Taddei et al. (2006) evaluated the diversity of metabolites produced by 71 *Streptomyces* isolates, and found only two isolates that showed the same pattern.

The strain 1S was characterized by cultural and micromorphological characteristics that are consistent with the assignment to the genus *Streptomyces*. The 16S rDNA sequence of strain 1S was compared to those of other *Streptomyces* species; it showed a sequence similarity of 96%, with *S. diastaticus* the most closely related species. In spite of the relative high molecular similarity of the two organisms (strain 1S and *S. diastaticus*) both strains showed similar patterns for carbohydrate assimilation but also there were some interesting physiological differences among them (Table5). This may also suggest that strain 1S is novel.

The results obtained from this study are promising and hence merit further studies concerning purification, characterization, and identification of active

secondary metabolites. Also, a further study should be carried out to identify the species of the isolates.

### **Acknowledgements**

We are grateful to the Coordenação e Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES/PROF) for financial support for this work and a scholarship for the student. To Dr. Maria Lúcia Scroferneker for kindly providing some samples of filamentous fungi.

### References

- Anderson AS, Wellington EMH (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evolution Microbiol* 51:797-814
- Aniboun M, Chait A, Zyad A, Taourirt M, Ouhdouch Y (2008) Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 2019-2025
- Badji B, Riba A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N (2005) Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *J Mycol Med* 15:211–219
- Barakate M, Ouhdouch Y, Oufdou KH, Beauliev C (2002) Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 49-54

- Basilio A, Gonzalez I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, Gonzalez A, Genilloud O (2003) Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol* 95: 814-823
- D'Arce RCF, Almeida RS, Silva TC, Franco AC, Spilki FR, Roehe PM, Arns CW (2002) Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol* 88, 315-324
- Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger E (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl Acid Res* 17: 7843-7853
- El-Naggar MY, El-Assar SA, Abdul-Gawad S (2006) Meroparamycin production by newly isolated *Streptomyces* sp. Strain MAR01: Taxonomy, fermentation, purification and structural elucidation. *J Microbiol* 44: 432-438
- Forar LR, Amany K, Ali E, Bengraa CH (2006) Taxonomy identification and biological activities of a novel isolate of *Streptomyces tendae*. *Arab J Biotechnol* 9: 427–436
- Forar LR, Ali E, Mahmoud S, Bengraa CH, Hacene H (2007) Screening, isolation and characterization of a novel antimicrobial producing actinomycete, strain RAF10. *Biotechnology* 4: 489–496
- Gottlieb D (1961) An evaluation of criteria and procedures used in the description and characterization of *Streptomyces*. A co-operative study. *Appl Microbiol* 9: 55-60.

Hacène H, Daoudi-Hamdad F, Bhatnagar T, Baratti JC, Lefebvre G (2000) H107 a new aminoglycoside anti-Pseudomonas antibiotic produced by a new strain of *Spirillospora*. *Microbios* 102: 69–77

Ilic SB, Konstantinovic SS, Todorovic ZB, Lazic ML, Veljkovic VB, Jokovic N, Radovanovic BC (2007) Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Microbiology* 76: 421-428

Iwai Y, Omura S (1982) Culture conditions for screening of new antibiotics. *J Antibiot* 35:123–141

Kern WV (2006) Daptomycin: First in a new class of antibiotics for complicated skin and soft-tissue infections. *Int J Clin Pract* 63: 370-378

Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghiova S, Boughachiche F, Zerizer H, Hamdiken H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P (2005) Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J Mycol Médicale* 15: 45-51

Lechevalier HA, Lechevalier MD (1967) Biology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 21: 71-100

Li J, Zhao GZ, Chen HH, Wang HB, Qin S, Zhu WY, Xu LH, Jiang CL, Li WJ (2008) Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. *Lett Appl Microbiol* 47: 574-580

Miranda MMFS, Almeida AP, Costa SS, Santos MGM, Lagrota MHC, Wigg MD (1997) In vitro activity of extracts of *Persea americana* leaves on acyclovir-resistant and phosphonoacetic resistant herpes simplex virus. *Phytomedicine* 4: 347–352

Ndonde MJM, Semu E (2000) Preliminary characterization of some *Streptomyces* species from four Tanzanian soils and their antimicrobial potential against selected plant and pathogenic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 16: 595-599

Reed LJ, Muench H (1938) A simple method for estimating fifty per cent end points. *Amer J Hygiene* 27: 493–498

Rintala H, Nevalainen A, Rönkä E, Suutari M (2001) PCR primers targeting the 16S rDNA gene for specific detection of streptomycetes. *Mol Cell Probes* 15: 337-347

Saadoun I, Gharaibeh R (2003) The Streptomycetes flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *J Arid Environ* 53:365-371

Sacramento DR, Coelho RRR, Wigg MD, Linhares LFTL, Santos MGM, Semedo LTAS, Silva AJR (2004) Antimicrobial and antiviral activities of actinomycetes (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. *World J Microbiol Biotechnol* 20:225-229

Sahin N, Ugur A (2003) Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. *Turk J Biol* 27: 79-84

Serkedjieva J, Ivanova E (1997) Combined protective effect of an immunostimulatory bacterial preparation and rimantadine hydrochloride in experimental influenza A virus infection. *Acta Virol* 41: 65-70

Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 13:313–340

- Shirling EB, Gottlieb D (1972) Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. V. Additional description. *Int J Syst Bacteriol* 22: 265–394
- Shiomi K, Hatae K, Hataro H, Matsumob A, Takahashi Y, Jiang CL, Tomoda, H., Kobayashi, S., Tanaka, H., Omura, S., 2005. A new antibiotic, actinomycin A<sub>9</sub> produced by *Streptomyces* sp. K01 – 0031. *J Antibiot.* 58, 74-78.
- Stackebrandt E, Witt D, Kemmerling C, Kroppenstedt R, Liesack W (1991b) Designation of Streptomycece 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 57: 1468-1477
- Taddei A, Valderrama M, Giarrizzo J, Rey-Maikahl C (2006) Chemical screening: A simple approach to visualizing *Streptomyces* diversity for drug discovery and further research. *Res Microbiol* 157: 291-297
- Thakur D, Yadav A, Gogoi BK, Bora TC (2007) Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J Mycol Médicale* 17: 242-249
- Wang J, Soisson SM, Young K, Shoop W, Kodali S, Galgoci A, Painter R, Parthasarathy G, Tang YS, Cummings R, Ha S, Dorso K, Motyl M, Jayasuriya H, Ondeika J, Herath K, Zhang C, Hernandez L, Allocco J, Basilio A, Tormo JR, Genilloud O, Vicent F, Pelaez F, Colwell L, Lee SH, Michael B, Felcetto T, Gill C, Silver L, Hermes JD, Bartizal B, Schmatz D, Becker JW, Cully D, Singh SB (2006) Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* 441: 358-361



Walksman SA, Henrici AT (1943) The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol* 46: 337-341.

Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176:386-90

Williams ST, Cross T. (1971) Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. *Methods Microbiol* 4: 295—333.

Williams ST, Goodfellow M, Alderson G (1989) Genus *Streptomyces*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams ST, Sharope Holt JG Eds. Baltimore pp. 241–258

Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PH, Sackin M (1983) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Appl Microbiol* 129:1743-813

## ARTIGO 2

### **Evaluation of antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. producing antibiotic substances inhibitory to multiresistant Enterococci**

(submitted to Microbiological Research)

Salamoni<sup>1</sup>, S. P., Antunes<sup>1</sup>, T. C., Mann, M.B., Frazzon<sup>1</sup>, A P. G., Germani<sup>2</sup>, J. C.,  
Van Der Sand<sup>1</sup> S. T.

<sup>1</sup> Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, <sup>2</sup> Laboratório de Tecnologia Bioquímica, Departamento de Produção de Matéria Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Author for correspondence: [svands@ufrgs.br](mailto:svands@ufrgs.br)

### **Abstract**

The aim of this study was to screen for antimicrobial activities of streptomycete isolates against multiresistant strains of *Enterococcus* species. The isolates were obtained from a composting process, and were identified based on morphological characteristics and molecular identification. The *Enterococcus* strains were isolated from food samples and clinic patients. The antimicrobial activity was determined using the double-layer agar method. The isolates that showed activity were grown in submerged culture using starch casein mineral liquid medium and glucose yeast malt extract medium. The bioactive metabolites were extracted from the cultures with ethyl acetate, and the antimicrobial activity of the filtrate and aqueous and organic fractions was evaluated. The bioactive metabolites were partially purified using TLC followed by autography against *E. faecium* 546. The filtrates were concentrated, and the aqueous extracts were used to assay the antimicrobial activity by the agar-well diffusion method. The aqueous extracts of six *Streptomyces* isolates were assayed against *E. faecium* by means of the microdilution method. All the strains of *Enterococcus* showed a multiresistant profile, with 100% of the isolates resistant to tetracycline. Six (24%) of the isolates

showed activity against the Enterococci strains. Antimicrobial activity was obtained with the filtered culture, and the best results were obtained when the isolates grew on SC medium. The isolates 3S, 48, and 50 showed the best results in the well diffusion and microdilution assays, where the MIC obtained was 15 mg/mL. The extracts from isolate 50 showed an active fraction with an Rf value of 0.3 (dichloromethane) and an Rf value of 0.13 when ethyl acetate was used as the solvent. The strain *Streptomyces* sp. 50 showed a maximum identity of 92% with the sequences from *Streptomyces thermocoprophylus*, and a similarity of 90-91% with *S. thermoviolaceus*, *S. termodistaticus*, *S. thermocianeomalatus*, *S. thermocyaneoviolaceus*, *S. albus*, and *S. cibemarensis*.

Key words: *Enterococcus*, multiresistent , *Streptomyces*, antibiotic,

## Introduction

Enterococci are normal inhabitants of the gastrointestinal tract of humans and animals (Franz et al., 2003), and are commonly found in foods such as meat, milk, and cheese (Riboldi et al., 2009). Enterococci are opportunistic pathogens, and are well known as major microorganisms associated with important nosocomial infections, including infections of the urinary tract, wounds, bloodstream, endocardium, and intra-abdominal sepsis. The importance of enterococci in nosocomial infections has grown in parallel with the emergence of strains resistant to many antimicrobial drugs used to treat human infections (Shepard and Gilmore, 2002; d'Azevedo et al., 2006; Macovei and Zurek, 2007). These organisms are intrinsically resistant to a wide variety of antibiotics such as penicillinase-resistant cephalosporins, penicillin, and low concentrations of aminoglycosides used to treat infections in humans, providing a selective advantage in the hospital environment (Haword, Gold & Moellering, 1996; Kak & Chow, 2002; Shepard & Gilmore, 2002).

Bacteria belonging to the genus *Streptomyces* and related actinomycetes are widely recognized as industrially important microorganisms,

producing many commercially and medically useful antibiotics, anti-tumor agents, and many other pharmaceutically useful compounds (Bibb, 2005; Laid et al., 2008). The use of antibiotics inevitably selects for resistant microbes, so there is a continuing and cyclical need for new antibiotics. An antibiotic's useful lifetime begins to diminish before clinically significant resistance emerges, impelling the need for new drugs to combat the current generation of resistant pathogens. Therefore, the aim of this study was to search for *Streptomyces* isolates that produce bioactive metabolites able to inhibit multi-resistant Enterococci isolated from different sources.

## **Material and Methods**

### Isolates

In this study, 25 *Streptomyces* isolates were used. The isolates were recognized on the basis of morphological features established by the International Streptomyces Project (ISP) (Shirling & Gottlieb 1966). The colonies with the color and characteristics of *Streptomyces* were further purified, and representative cultures were preserved in our own laboratory culture collection (Oliveira, 2002).

### Molecular analysis of the isolates

In order to confirm the morphological identification of the isolates, genomic DNA was extracted following the protocol described by Hopwood et al. (2000). A pair of primers for the amplification of the 16S rRNA fragment, designed by Edwards et al.

(1989), was used: pA: (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG'3) and reverse pF: (5' ACGAGCTGACGACAGCCATG'3). The PCR reaction was carried out in 0.2 ml tubes with a total volume of 25  $\mu$ l. The mixture contained 1X reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq polymerase, 0.1  $\mu$ M of each primer, 0.2 mM of deoxynucleotide, and 20 ng of DNA. The reaction mixture was subjected to 35 cycles of amplification (1 min at 94 °C, 1 min at 58 °C, and 2 min at 72 °C) with a final extension at 72 °C for 10 min. The reaction products were analyzed by electrophoresis for 90 min at 75V in 0.8% agarose gel.

*Hha*I. The reactions were prepared following the manufacturer's instructions individually for each enzyme. All reactions were repeated twice. The reaction products were analyzed by electrophoresis for 1 h 30 min at 75V in 2% agarose gel.

#### Antimicrobial susceptibility of test microorganisms

Ten *Enterococcus* strains belonging to four species: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. alinarium*, and *E. hirae* were used in this study in order to evaluate the antimicrobial activity of the 25 *Streptomyces* strains. The origins of the *Enterococcus* strains were: 2 ATCC strains (*E. hirae* ATCC 10541 and *E. faecium* ATCC6569); four isolated from hospital patients (strains 151, 591, 546 and 612); and four obtained from food samples (strains 11E, 12E, 22E and 24E). All these

isolates belong to our laboratory collection, and were selected according to their pattern of antimicrobial resistance.

The susceptibility to antimicrobials was evaluated by the disk-diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). The following 15 antimicrobial agents were tested: amikacin (30 µg), ampicillin (10 µg), bacitracin (10 UI), cephoxitin (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), cloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (120 µg), imipenem (10 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), novobiocin (5 µg), penicillin G (10 UI), tetracycline (30 µg), and vancomycin (30 µg).

#### Antimicrobial activity evaluation

##### Primary screening

Preliminary screening for antimicrobial activity of the *Streptomyces* strains was done using the double-layer agar method. *Streptomyces* isolates were inoculated using the spot inoculation method onto plates with mineral salts-starch-casein-agar (SCA) medium (10.0 g starch, 0.3 g casein, 2.0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.0 g NaCl, 2.0 g KNO<sub>3</sub>, 0.05 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01 g Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 15.0 g agar) and incubated at 30° C for 14 days. Each plate was inoculated with four different isolates of *Streptomyces*, and three plates were prepared for each test microorganism. The *Enterococcus* strains to be tested were grown on trypticase soy broth (TSB) until the concentration of 10<sup>8</sup> cells/mL was reached. One milliliter (1 mL) of each bacterial



culture was mixed with 9 mL of Mueller-Hinton agar and poured over the layer with *Streptomyces* grown on the plate. After the inoculation, the plates were incubated for 24-48 h at 37°C and the halo formation was evaluated.

#### Fermentation and extraction

The highly active isolates in agar medium were grown in submerged culture in 250 mL flasks containing 50 mL of mineral starch casein broth (SC) and glucose extract-yeast malt broth (ISP2). Inoculation was performed with a 10% culture of each isolate, grown for 48 h. These cultures were grown in a rotary shaker at 150 rpm at 30°C for seven days. Each of the resulting culture broths (approximately 50 mL) obtained following the growth of each isolate in each culture medium was separated from the mycelium by centrifugation. The supernatant, sterilized by filtration, was used to assess the extracellular antimicrobial activity by the agar-well diffusion method against the test microorganisms. The crude antimicrobial compound was recovered from the culture filtrate of each active isolate by solvent extraction with ethyl acetate. Ethyl acetate was added to the filtrate in the ratio 1:2 (v/v) and shaken vigorously for 30 min. The extraction was repeated three times. The organic layers were collected, and the organic solvent was evaporated to dryness in a vacuum evaporator at 40°C to obtain a gummy crude extract. The aqueous extracts were lyophilized. The organic and aqueous extracts were dissolved in ethyl acetate and in PBS, respectively.

### Antibacterial activity

The antimicrobial activity of the filtrates and the aqueous and organic extracts was tested with all the test organisms. Using a sterile cork borer, wells were punctured in plates containing Mueller-Hinton agar previously seeded with one of the test organisms. One hundred microliters (100  $\mu$ L) of supernatant of each isolate was added in each well. The plates were incubated at 8-10 °C for 16 h for the diffusion of the bioactive compound, and then after the incubation at 37 °C for 24 h. Following incubation, inhibition zones were measured. All assays were carried out in triplicate.

### Active compound isolation

Thin Layer Chromatography (TLC) was used for partial characterization of the active aqueous extracts from isolates 3S, 48A, and 50A. Samples were spotted onto silica gel plates (Macherey-Nagel, Alugram Sn. G/UV254) and then developed with the following solvents: dichloromethane, ethyl acetate, chloroform, methanol, butanol, acetone, hexane, and water. Different combinations of the solvents were tested. The efficiency of the compound migration was observed under UV light. Each batch was repeated several times to confirm the results.

### Microdilution Method

The extracts were used in the antimicrobial assay, following the standard broth microdilution method (CLSI, 2009). Mueller-Hinton broth was prepared and sterilized. The required concentration of the extract ( $\log_2$  until dilution 1:64) was added to a 96-well micro titer plate containing 100  $\mu$ L of broth. A log-phase culture of *Enterococcus faecalis* 546 was introduced into the respective wells, and the final inoculum size was  $1 \times 10^5$  UFC/mL. The plates were incubated at 37 °C for 18 h. A positive control and solvent controls were also included in the plate. Ten microliters of test broth was seeded onto TSA plates to assess the viability of the organism. The MIC was determined as complete growth inhibition at the lowest concentration of the compound tested.

#### Genetic characterization of strain 50

The 16S rDNA of strain 50 was partially amplified using two primers, forward pA (5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG'3) and reverse pH (5' AGGAGGTGATCCAGCCGCAC 3') designed by Edwards et al. (1989). The amplification was carried out in 0.2 ml tubes in a total volume of 50  $\mu$ l. The mixture contained 1X reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq polymerase, 0.1  $\mu$ M of each primer, 0.3 mM deoxynucleoside, and 20 ng DNA. The amplification conditions were the same as described above. The PCR product was detected by agarose gel electrophoresis and was observed by ultraviolet (UV) fluorescence after ethidium bromide staining.

The PCR product obtained was sequenced by an automated sequencer. The same primers as above, plus some internal primers were used for this purpose. The sequence was compared for similarity with the reference species of bacteria contained in genome databases, using the NCBI BLAST available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

#### Biochemical and physiological characterization of *Streptomyces* strains

For the biochemical and physiological studies of the strains, 36 tests were performed, including the utilization of 14 carbohydrate compounds evaluated in basal carbon medium (ISP9), the utilization of seven nitrogen sources, the degradation of organic compounds (milk casein, cellulose, Tween 80, gelatin, starch, esculin, urea) H<sub>2</sub>S production, production of melanoid pigments in ISP1 medium, diffusible pigments, and nitrate reductase. The strain was also tested for its ability to grow in medium supplemented with sodium chloride at concentrations of 4%, 7%, 10%, and 13%, and at temperatures of 20, 37, and 45°C. All cultures were incubated at 28± 2°C for 10 days, except for gelatin liquefaction (21 days). The morphology of the spores was examined by electron microscopy.

## **Results and Discussion**

### Antimicrobial susceptibility of test microorganisms

The 10 *Enterococcus* strains used in this study are multiresistant to antimicrobials. For this reason, the susceptibility of the isolates was tested against 15 antimicrobial compounds. All strains were resistant to at least three of the antimicrobials tested. Among the 10 strains, six different profiles of susceptibility were observed, and four isolates showed the same profile, being resistant to five antimicrobials. *E. hirae* was the most susceptible strain, and five isolates (11E, 12E, 151, 546, and 612) were resistant to six or more antimicrobials (Table 1). Although all *Enterococcus* strains were resistant to tetracycline, the frequency of resistance to norfloxacin and vancomycin was 30% and 20% lower respectively. All strains were susceptible to ampicillin, imipenem, and nitrofurantoin. Similar results have been reported by other authors describing the high sensitivity of *Enterococcus* isolates to antimicrobials, including nitrofurantoin (100%), ampicillin (96.6%), and vancomycin (100%) (Bedendo et al., 2003). The high resistance to tetracycline shown by the enterococci strains in this study differs from the observations by Fracallanza et al. (2007).

Table 1. Antimicrobial profile of *Enterococcus* species used as test organisms.

Isolate	source	A	Am	B	CF	CI	CL	E	G	I	NI	N	NV	P	T	V
<i>E. faecium</i>	ATCC	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. hirae</i>	ATCC	R	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>E. alinarium</i> (11E)	Clinical	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R

<i>E. faecium</i> (12E)	Clinical	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R
<i>E. faecalis</i> (22E)	Clinical	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	I	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> (24E)	Clinical	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> (151)	Food	R	S	R	R	I	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> (546)	Food	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> (591)	Food	R	S	R	R	I	S	I	R	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> (612)	Food	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S

A-amicacin; Am- ampicillin; B-bacitracin; CF-cephoxitin; CI- ciprofloxacin; E-eritromycin; G-gentamicin; I-imipenem; NI- nitrofurantoin; N- norfloxacin; NV- novobiocin; P- penicillin, T-tetracyclin; V- vancomycin

The susceptibility profiles of *Enterococcus* strains have been studied by different workers, and the common observation is the dissemination and growing emergence of resistance among these microorganisms and other Gram-positive bacteria. However, there is special concern when the resistance genes are associated with plasmids or transposons that are also related to genes of pathogenicity (Franz et al., 2003, Amyes, 2006).

#### Molecular characterization of *Streptomyces* isolates

The *Streptomyces* isolates were amplified with the primers pA and pF, and the products of approximately 1030 bp were digested with the restriction enzymes *Ban*II and *Hha*I. From the amplified fragment digested with *Ban*II, four different fragments were obtained (Figure 1); the digestion profile was the same for all 25 isolates. For the *Hha*I digestion, five different profiles were observed among the isolates. Figure 1 (lines 2 to 6) shows the profile obtained with *Hha*I, where the

profiles (d) and (e) were unique, and profiles (a), (b), and (c) were distributed among the other *Streptomyces* isolates.

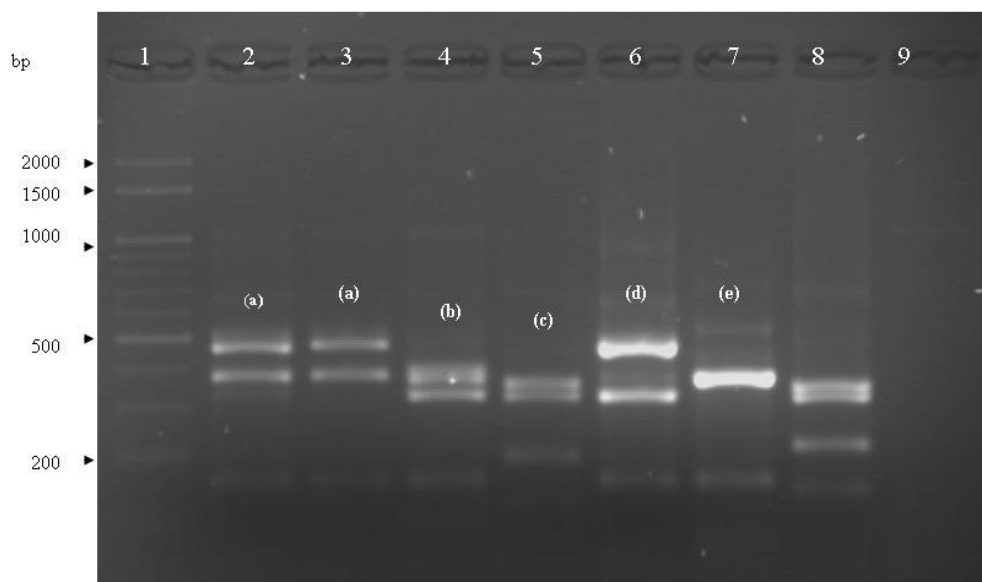


Figure 1. Amplification products using primers pA and pF digested with restriction enzymes *Hha* I (2 – 7) e *Ban* II (8). Lane (1) ladder 100bp, (2) *S. rochei*, (3) isolate 1S, (4) 2S, (5) 28, (6) 36, (7) 37, (8) 1S, (9) Non digested product. Different profiles obtained with *Hha*I restriction enzyme: (a)-(e)

The genus *Streptomyces* shows a high morphological and genetic diversity, which makes this group one of the most species-rich genera, with 562 species and 38 subspecies (Euzéby, 2009). The metabolic and genetic diversity of these microorganisms has been widely exploited in industry and agriculture (Mehling et al., 1995; Martin 2000, Taddei, 2006). Lanoot et al. (2004) observed a high genetic diversity among 451 *Streptomyces* species using BOX sequences, finding 370 unique profiles among the isolates. Taddei (2006) also reported a wide metabolic diversity of *Streptomyces* species. Mehling et al. (1995) evaluated the

diversity of different species of *Streptomyces* using PCR-RFLP with the primers pA and pH designed by Edwards et al. (1989). The amplification product was digested with *EcoRI*, *KpnI*, and *HincII*, and the profile was unique for all isolates. In our study, the primers used were pA and pF, which resulted in different profiles after digestion with *HhaI*.

#### Antimicrobial activity evaluation

The present study screened 25 *Streptomyces* isolates against 10 multiresistant strains of *Enterococcus* spp., to assess for bioactive metabolites.

In the preliminary screening, 24% (6) of the isolates were active against one or more test microorganisms. Isolates 2S and 3S inhibited all *Enterococcus* strains; isolates 8S, 48, and 50 inhibited 9 test organisms; and isolate AP was able to inhibit 8 enterococci strains (Table 2). All the other *Streptomyces* isolates were unable to inhibit multiresistant enterococci. Basilio et al. (2003) searched for antimicrobial activity of 235 *Streptomyces* isolates, and they observed that 25% of the isolates were active against *Enterococcus*.



Table 2: *Streptomyces* isolates that showed antimicrobial activity against *Enterococcus* strains on solid medium. Preliminary screening.

Strains	2S	3S	8S	48	50	AP
<i>E. faecium</i> ATCC	+	+	-	+	+	+
<i>E. hirae</i> ATCC	+	+	+	-	-	+
<i>E. galinarium</i> (11E)	+	+	+	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (151)	+	+	+	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (546)	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> (591)	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> (612)	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i> (12E)	+	+	+	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (22E)	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i> (24E)	+	+	+	+	+	+

+ inhibition

The six isolates that showed antimicrobial activity against all *Enterococcus* strains were cultivated in submerged cultures of ISP2 and SC media. These isolates were able to grow in liquid media, and showed antibacterial activity in the filtered extract (Table 3). All the isolates were able to inhibit all 10 test strains; the exceptions were isolate AP and the extracts obtained from isolates 48 and 50 grown in ISP2. For isolates *Streptomyces* 3S, 48, and 50, antimicrobial activity was observed in the filtrate and in the aqueous and organic fractions as

well. These results indicate that the synthesis of antimicrobial metabolites depends on the constituents of the medium. In fact, the results showed that antibiotic production was better in SC, a mineral medium, than in ISP2, a richer medium. It has been reported that environmental factors such as temperature, pH, and incubation conditions have a profound influence on antibiotic production (Omura et al., 1973; Arasu et al., 2009).

Table 3. Antimicrobial activity of six highly active *Streptomyces* isolates against *Enterococcus* strains using the *Streptomyces* culture extracts in the agar-well diffusion method . Inhibition zone was measure in millimeters (mm)

Strains	2S	3S	8S	48	50	AP	48	50
Culture media	SC	SC	SC	SC	SC	SC	ISP2	ISP2
<i>E. faecium</i>	20	18	18	20	20	12	20	21
<i>E. hirae</i>	20	15	16	20	18	12	19	20
<i>E. galinarium</i> (11E)	25	20	22	25	22	-	-	-
<i>E. faecium</i> (12E)	20	14	16	18	18	-	18	20
<i>E. faecalis</i> (22E)	18	15	14	19	18	-	20	22
<i>E. faecium</i> (24E)	25	21	20	24	25	-	24	26
<i>E. faecalis</i> (151)	23	19	18	25	21	-	25	24
<i>E. faecalis</i> (546)	24	17	13	22	22	-	22	22
<i>E. faecalis</i> (591)	23	14	16	21	18	-	22	20
<i>E. faecalis</i> (612)	21	16	12	21	20	-	24	24

Active compound isolation

Thin Layer chromatography (TLC) of the isolate 50 extract showed two points with activity against the isolate *Enterococcus faecium* 546. With the dichloromethane/methanol solvent system, the active components were marked as component 1 with an Rf value of 0.3, and component 2 with an Rf value of 0.13.

Many isolates of *Streptomyces* have been described as producing different types of antimicrobials. *S. roseosporus* produces daptomycin, an antimicrobial with a wide spectrum of activity used in human therapy (Steenbergen et al., 2005). Rhee (2002), working with a strain of *Streptomyces* sp. KH-614, was able to isolate a powerful antibiotic with a MIC 40 times lower than vancomycin and teicoplanin, but with activity against 12 strains of *E. faecium* and *E. faecalis* VanA and VanB. Other antimicrobials such as mannopeptimycin and munumbibin A and C, isolated from *Streptomyces* sp., have been characterized and show great potential against multiresistant microorganisms (Castilho et al., 2002). These and other metabolites produced by this group of microorganisms emphasize the importance of the genus *Streptomyces* as an important source for new bioactive metabolites (Castilho et al. 2002; Singh et al., 2003, Arasu et al., 2009).

#### Microdilution Assay

The antimicrobial activity of 16 extracts was tested by the microdilution assay (CLSI). Twelve extracts resulted from the six *Streptomyces* isolates grown in SC medium (aqueous and organic fraction), and four extracts were obtained from isolates 48 and 50 grown in ISP2 medium (aqueous and organic fractions).

Antimicrobial activity against strain *Enterococcus faecalis* 546, was observed in only 10 (62.5%) of the extracts. Filtrate extracts from isolate 48 grown on SC and ISP2 media were active without any dilution. Extracts from isolates 3S, 48, and 50 grown in SC medium were active against Enterococci, with a MIC of 15 mg/mL. Extracts from isolates 48 and 50 grown in ISP2 medium were active, with a MIC of 30 mg/mL.

#### Genetic characterization of strain 50

The partial sequence of the 16S rDNA of this isolate was aligned and compared with all 16S rDNA gene sequences available in the GenBank and EMBL databases. The strain *Streptomyces* sp. 50 showed a maximum identity of 92% with the sequences from *Streptomyces thermocoprophilus*, and a similarity of 90-91% with *S. thermoviolaceus*, *S. thermodiastaticus*, *S. thermocianeomalatus*, *S. thermocyaneoviolaceus*, *S. albus*, and *S. cibemarensis*.

#### Identification and characterization of strain 50

Based upon its morphological and biochemical characteristics, the isolate *Streptomyces* sp. 50 was confirmed as belonging to the genus *Streptomyces*. Microscopic examination of the isolate revealed that the aerial mycelia were morphologically branched, with the spore chain retinaculum-apertum the spore mass white and gray (Figure 2). Scanning electron microscopy showed spores with a smooth surface. The physiological and biochemical parameters of strain 50 are listed in Table 4.

The result of the 16S DNA partial sequence showed a 91% similarity with other sequences available today. The phenotypic, morphological, and physiological data together with the sequence result did not permit any further identification of species. Many investigators who have worked with *Streptomyces* with a very high genetic similarity have been able to distinguish species on the basis of numerical classification, due to their large differences, with morphological and biochemical data (Meyser et al., 2003; Petrosyan et al., 2003; Kim et al., 2006).

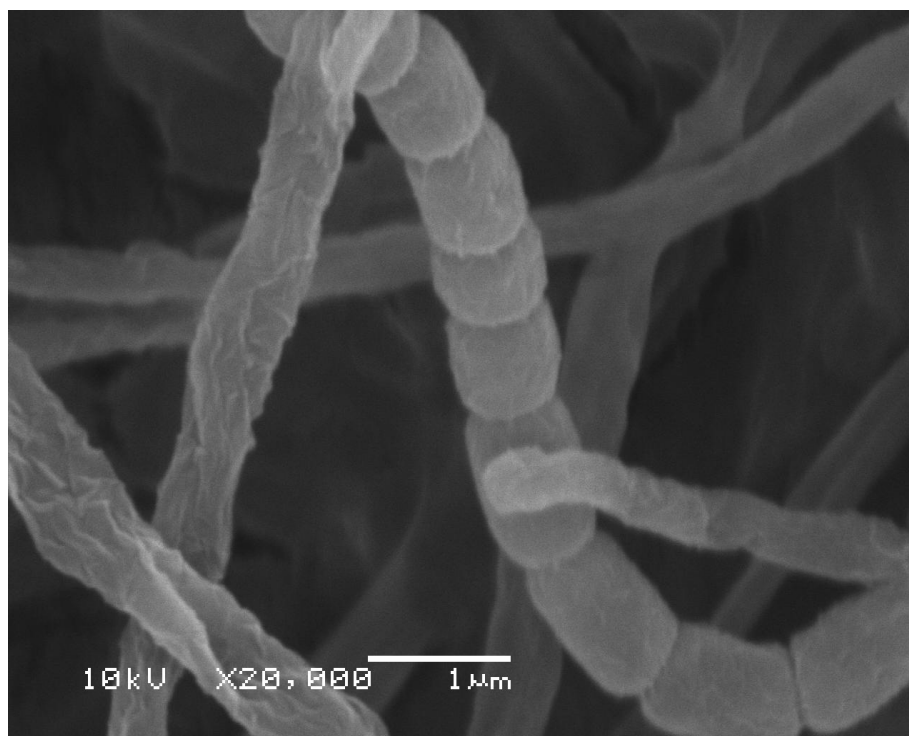


Figure 2. Spore surface ornamentation of isolate *Streptomyces* sp. 50.

Table 4. Biochemical and morphological characteristics of isolate *Streptomyces* sp.

50

Biochemical characteristics	Isolate 50	Biochemical characteristics	Isolate 50
Color of spore mass	Gray/white	D-Fructose	+
Spore surface	smooth	D- Galactose	+
Melanin production	-	D-Lactose	+
Starch	+	Manitol	+
Casein	+	D-Mannose	+
Tween	+	Mezoinositol	+
Gelatin	+	L-Rhamnose	+
Nitrate	+	Raphinose	-
Urea	-	Salicin	+
H <sub>2</sub> S	+	Threalose	+
Growth in NaCl 7%	-	Xylose	+
Growth in NaCl 10%	-	Alanine	+
Growth in NaCl 13%	-	Phenylalanine	+
37°C	+	Triptophano	-
45° C	+	Methionine	+
Adonitol	-	Serina	-

Arabinose	+	Threonine	+
Cellobiose	+		

## References

- Amyes SGB. Enterococci and Streptococci. Intern J Antimicrob Agen 2007;3:S43-S52.
- Arasu MV, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). J Mycol Médic 2009;19: 22-28.
- Basilio A, Gonzalez I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, Gonzalez A, Genilloud O. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. J Appl Microbiol 2003;95:814-823.
- Bedendo J, Siqueira VLD, Cardoso CL, Borelli SD. Estudo do perfil de susceptibilidade antimicrobiana e avaliação molecular de amostras de *Enterococcus* spp isoladas de pacientes hospitalizados. Acta Scient Heal Sci 2003;25:35-40.
- Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in Streptomyces. Curr Opin Microbiol 2005;8:208–215
- Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, Hess WM, Porter H, Jensen JB, Albert H, Robison R, Condrón MAM, Teplow DB, Stevens D, Yaver D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. Microbiol 2002;148:2675-2685.

D´Azevedo PA, Dias CAG, Teixeira LM. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from Southern region of Brazil. *Rev Inst Med Trop* 2006;48 (11):11-16.

Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Ernd M, Böttger E. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 1989;17 (19):7843-.

Franz CMAP, Stiles ME, Scherfer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *Internat J Food Microbiol* 2003;88:105-122.

Euzeby J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature <http://www.bacterio.cict.fr> Acesso 31 outubro 2009.

Hopwood DA, Kieser T, Chater KF, Bibb MJ, Buttner MJ *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Centre. Baltimore. 2002,

Howard S. Gold, M.D., Robert C. Moellering, M.D. Antimicrobial-Drug Resistance. *New England Journal of Medicine* **335:1445-1453**

Kak V & Chow J W. Acquired antibiotic resistances in enterococci. In *The Enterococci; Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2002, p..355–357

Kim HJ, Lee SC, Wang, BK. *Streptomyces cheonanensis* sp. nov. , a novel streptomycete wuth antifungal activity. *Internat J Syst Evol Microbiol* 2006;56: 471-475.



Lanoot B, Vancanneyt M, Dawyndt P, Cnockaert M, Zhang J, Huang Y, Liu Z, Swings J BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces* emended descriptions proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus*, *S. phaeropurpureus*. *Syst Appl Microbiol* 2004;27:84-92.

Macovei L, Zurek L. Influx of enterococci and associated antibiotic resistance and virulence genes from ready-to-eat food to the human digestive tract. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:6740–6747.

Martin, P. Identification and typing *Streptomyces* strains evaluation interspecific, intraspecific and intracolonial differences by RAPD fingerprinting. *Res Microbiol* 2000;151:853-864, 2000.

Mehling A, Weihmeier UF, Peipersberg A. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay in identifying conserved regions of actinomycetes genomes *FEMS Microbiol Lett* 1995;128:119-126.

Meyers PR, Porter DS, Omorogie C, Pule JM, Kwetane T. *Streptomyces speibonae* sp. nov., a novel streptomycete with blue substrate mycelium isolated from South African soil. *International J Syst Evol Microbiol* 2003;53:801-805.

Murray BE . Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New Engl J Med* 2000;342:710–721.

Nedialkova D and Naidenova M. Screening the Antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. *J Cult Collect* 2005;4:29-35.

Oliveira MF. Identificação de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002. p 124.

Petrosyan P, Garcia-Varela M, Luz-Marigal A, Huitrôn C, Flores ME. *Streptomyces mexicus* sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. International J Syst Evol Microbiol 2003;53:269-273.

Laidi RF, Sifour M, Sakr M, Hacene H. A new actinomycete strain SK4-6 producing secondary metabolite effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* World J Microbiol Biotechnol 2008;24:2235.

Rhee K. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp K\_614 producing anti-VRE (vancomycin resistant enterococci) antibiotics. Gen Appl Microbiol 2002;48:321-327.

Riboldi GP, Frazzon J, Azevedo PA, Frazzon APG. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp isolated from food in Southern Brazil Brazilian Journal of Microbiology 2009;40:125-128.

Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance Microbes Infect 2002;4:215-224.

Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int.J.Syst Bacteriol 1966;13:313–340.

Shirling EB, Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. V. Additional description. Int J Syst Bacteriol. 1972; 22:265–394.

Singh MP, Petersen PJ, Weiss WJ, Janso JE, Luckman SW, Lenoy EB, Bradford PA, Testa RT, Greenstein M. Mannopeptimycin, New Cyclic Glycopeptide Antibiotics produced by *Streptomyces hygroscopicus* LL-AC98: Antibacterial and Mechanistic Activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47 (1):62-69.

Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005;55:283-288.

Taddei A, Valderrama M, Giarrizzo J, Rey-Maikahl C. Chemical screening: A simple approach to visualizing *Streptomyces* diversity for drug discovery and further research. *Res Microbiol* 2006;157:291-297.

### ARTIGO 3

#### **Estudo de Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp . 1S**

(A ser submetido para o Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology)

Sabrina Pinto Salamoni<sup>1</sup>, José Carlos Germani<sup>2</sup>, Sueli Teresinha Van Der Sand<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>*Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>2</sup>*Laboratório de Tecnologia Bioquímica, Departamento de Produção de Matéria Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

Autor para correspondência: \* S .T. Van Der Sand, e-mail: [svands@ufrgs.br](mailto:svands@ufrgs.br),  
fone/fax: 55 51 3308 4111

## RESUMO

Em estudo preliminar de avaliação da atividade antimicrobiana, um isolado de *Streptomyces* caracterizado como linhagem 1S foi selecionado devido ao seu alto potencial como produtor de metabólito bioativo, Este isolado apresentou um amplo espectro de atividade, inibindo bactérias Gram positivas, Gram negativas, leveduras, e fungos filamentosos de interesse clínico e fitopatogênicos. Neste estudo foi avaliada a influência das condições ambientais como meio de cultivo, temperatura, cultivo estático ou com agitação e tempo de crescimento na 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). E as condições avaliadas ainda incluíram as temperaturas de 28, 30, 35 e 40 °C. A cada coleta de amostra foi determinada a atividade antimicrobiana, pH, biomassa. Das condições de cultivo avaliadas a melhor atividade antimicrobiana foi observada nos extratos provenientes do crescimento de *Streptomyces* sp. 1S em meio de cultura ISP2, a uma temperatura de 28 °C e com 96 horas de cultivo. Nestas condições, o isolado

inibiu quinze, dos dezeseite microrganismos teste empregados neste estudo, incluindo microrganismos multiresistentes como *Staphylococcus aureus* MRSA, *Enterococcus sp.* e *Salmonella* Enteritidis com um MIC de 25 mg/mL.

Palavras chave: atividade antimicrobiana, produção, caracterização

## **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 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 bioativos.

Entre as bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Enterococcus sp.* são de grande importância em virtude da incidência destes em diferentes infecções e da resistência a diferentes classes de antimicrobianos. Mais recentemente a daptomiina, linezolido e quinupristina têm sido empregados no tratamento de infecções causadas por estes microrganismos (Jevitt et al. 2003, Macovei & Zurek L, 2007, Fischbach & Walsh, 2009).

Bastonetes Gram negativos como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella* sp, *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacter* sp são responsáveis por 80% das infecções nosocomiais e adquiridas, incluindo infecções do trato respiratório, trato urinário, infecções gastrintestinais e bacterimias. O aumento da resistência a aminoglicosídeos e betalactâmicos de terceira e quarta geração tem sido observado especialmente para *K. pneumoniae*, *P. aeruginosae* e *E. coli* (Sader et al., 2003, Augusti et al., 2007).

As infecções fúngicas invasivas causadas principalmente por *Candida* sp., *Fusarium* sp. e *Criptococcus neoformans* tem levada a mortalidade e morbidade de inúmeros pacientes, especialmente os imunocomprometidos, (Andriole, 1999; Ouhdouch, 2001, Bachiega et al., 2005).

Nas últimas décadas, o emprego de microrganismos como biocontroladores tem encontrado destaque, pois representa uma medida alternativa ao controle químico e a rotação de culturas, utilizados para controlar a incidência de fitopatógenos em diferentes cultivares (Gava et al., 2002).

Streptomicetes são microrganismos Gram positivos, apresentam um complexo ciclo de vida com diferenciação morfológica similar aos fungos filamentosos e são conhecidos por produzir uma grande variedade de compostos biologicamente ativos (Al Tai et al., 1999; Li et al., 2002; Oskay et al., 2004; Pandey et al., 2005; Shiomi, 2005; Xu et al., 2005).

A produção destes diferentes metabólitos é regulada por fatores físico-químicos, como a temperatura de crescimento, período de incubação, pH,

composição do meio de cultura, fonte de carbono, de nitrogênio, entre outros. Para otimizar a produção destes fármacos, diferentes estudos veem sendo 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 influencia das condições ambientais na biosíntese destes compostos (Hassan et al., 2001, Asagbra et al., 2005, Pandey, 2005, Narayana & Vijayalakshmi, 2008, Takur et al., 2009).

Em um estudo preliminar de avaliação da atividade antimicrobiana, um isolado de *Streptomyces* caracterizado como linhagem 1S foi selecionado devido seu alto potencial como produtor de metabólito bioativo (Salamoni et al., 2009, submetido). Este isolado apresentou amplo espectro de atividade antimicrobiana, inibindo bactérias Gram positivas, Gram negativas, leveduras e fungos filamentosos. Considerando o potencial do isolado *Streptomyces* sp. 1S e a necessidade de novos antimicrobianos este trabalho teve por objetivo avaliar a influencia de diferentes condições ambientais como meio de cultivo, temperatura de crescimento e tempo na produção de moléculas bioativas e proceder a sua caracterização.

## **Materiais e Métodos**

Perfil de suscetibilidade dos microrganismos



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). O isolado 1S foi cultivado em meio ISP2, durante sete dias, a temperatura de 30 °C sob agitação. Os microrganismos teste foram cultivados em meio triptcaseína de soja por 6-8 horas, até atingir a escala 0,5 MacFarland.

Para este ensaio foram empregados 12 antimicrobianos: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), cefoxitina (30µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), norfloxacina (10µg), penicilina G (10UI), tetraciclina (30µg), trimetoprim (5µg), polimixina B (300 UI), vancomicina (30µg).

Avaliação do meio de cultura e da temperatura para produção de moléculas bioativas

*Streptomyces* sp 1S foi cultivado por 10 dias em sete diferentes meio de cultura: caldo amido caseína (AC - 10 g Amido,; 0,3g caseína, 2,0 g NaCl,; 2,0g KNO<sub>3</sub>, 2,0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05g MgSO<sub>4</sub>, 0,01g FeSO<sub>4</sub>), caldo Czapeck Dox modificado (CpD - 30,0g sacarose, 1,0g NaCl, 2,0g KNO<sub>3</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub>, 0,05g KCl, 0,01g FESO<sub>4</sub>, 1,0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,), meio proposto por Sahin (S - 0,8g NaCl, 1,0g NH<sub>4</sub>Cl, 0,1g KCl, 0,1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2g MgSO<sub>4</sub>, 0,04g CaCl<sub>2</sub>, 2,0g glicose, 3,0g extrato de levedura), meio Bennett's (B - 2,0g Peptona bacteriológica, 1,0g extrato de levedura, 1,0g extrato de carne, 10,0g glicose, 0,05g MgSO<sub>4</sub>), caldo nutritivo (CN - 1,0g extrato de levedura, 5,0g peptona bacteriológica, 1,0g extrato de carne,

4,0g NaCl.), meio extrato de malte e levedura (ISP2 – 4,0g extrato de levedura, 10,0g extrato de malte, 4,0g glicose,) e caldo triptcaseína de soja (TSB).

Um inóculo de 10% do volume, crescido por 48 horas, foi transferido para Erlemmeyers de 250 mL com 50 mL de meio de cultura. As culturas foram incubadas a temperatura de 28, 30, 35 e 40 °C, sob agitação constante de 150 r.p.m. 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 determinada com as amostras do décimo dia, sendo empregado os microrganismos teste *P. thomii*, *F. oxysporium* e *T. mentagrophyte*. O pH foi determinado a cada 48 horas.

Ensaio de atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em poços

Para ensaio de atividade antimicrobiana, placas contendo o meio agar triptcaseína de soja e agar Sabouraud foram previamente semeadas com o microrganismo teste (bactérias e levedura suspensão de  $10^8$  células/mL, fungos filamentosos suspensão  $10^6$  esporos/mL). Seis cilindros de 9 mm de diâmetro foram cortados e removidos das placas e 100 µL do sobrenadante de cada cultura foi adicionado nos mesmos. As placas foram então mantidas por 16 horas a temperatura de 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 foi determinada em três repetições.

### Curva de produção de metabolitos bioativos

O isolado foi cultivado em meio ISP2 e a temperatura de 28 °C, por sete dias 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 de atividade antimicrobiana foram utilizados 17 microrganismos teste.

### Extração e avaliação da atividade antimicrobiana

As amostras coletadas dos diferentes dias, foram filtradas em membrana de 0,22 µm. 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 vagorosamente por 30 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes. A fração orgânica foi submetida a rotavapor e a fração aquosa foi liofilizada. O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado com a fração bruta, aquosa e orgânica contra oito microrganismos teste.

### Efeito da temperatura sobre a atividade antimicrobiana

O efeito da temperatura foi avaliado com as amostras provenientes do segundo e quarto dia de crescimento. Uma alíquota de 500 µL foi incubada a temperatura de 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C durante 60 minutos e também submetidos a

autoclavação. Após, foi determinada a atividade antimicrobiana residual contra *S. aureus*, pela técnica da difusão em poço.

#### Método de Microdiluição

A fração aquosa do quarto dia de produção foi empregada para determinar a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foram empregados os microrganismos *S. pyogenes*, *S. aureus* resistente a metilina (*MRSA*), *Salmonella Enteritidis*, *P. aeruginosa* e *Candida albicans*.

A amostra (50 mg/mL) foi diluída em TSB, na proporção de 1:2 até a diluição 0,19 mg/mL. Um volume de 100 µL de cada diluição foi distribuído poços de microplacas com 96 poços onde foi adicionada uma suspensão da cultura do microrganismo teste (concentração final de 10<sup>5</sup> UFC/mL). As placas foram incubadas a 28-37 °C por 18-24 horas. Uma alíquota de 20 µL de cada poço foi semeada em placas de TSA para verificar a viabilidade dos microrganismos teste.

**Tabela 1.** Microrganismos teste empregados no ensaio de difusão em poço.

<b>Bactérias Gram positivas</b>	<b>Bactérias Gram negativas</b>
<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 cholerasius</i> ATCC 13076
	<i>Salmonella Enteritides</i> SE 86*

---

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*\*\*

**Fungos**

*Candida albicans* ATCC 10231

*Penicillium thomii*

*Fusarium oxysporum*

*Tricophytum mentagrophytes*

---

ATCC- American Type Culture Collection; \*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 a coleção do laboratório.

## Resultados e Discussão

*Streptomyces* sp. 1S em um estudo preliminar foi selecionado para estudos de produção de metabólitos bioativos (Salamoni et al., 2009). Este microrganismo apresentou um amplo espectro de atividade antimicrobiana. O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos mostrou resistência a ampicilina, penicilina, cefoxitina, trimetoprim, e eritromicina (Tabela 2). Das bactérias Gram positivas empregadas neste estudo, MRSA e *E. faecium* foram resistentes a cinco e quatro antimicrobianos respectivamente. Entre as bactérias Gram negativas foi observada maior resistência em *Salmonella* Enteritidis *que* foi resistente a sete dos doze antimicrobianos empregados neste estudo, e *Ralstonia solanacearum* a seis antibióticos incluindo vancomicina. Dos antimicrobianos avaliados, eritromicina e vancomicina foram os menos suscetíveis, 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 e 92% dos isolados.

**Tabela 2.** Perfil de suscetibilidade de bactérias teste frente a 12 antimicrobianos

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>B. subtilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S
<i>E. faecium</i>	R	S	R	S	S	I	R	I	S	-	R	S
<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	--	S	S
<i>MRSA</i>	R	S	R	R	I	I	R	S	S	-	S	R
<i>S. pyogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S
<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	I
<i>K. pneumoniae</i>	I	R	S	S	S	R	I	S	R	S	S	R

<i>P. brasiliensis</i>	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R
<i>P. aeruginosa</i>	S	S	S	R	I	I	S	S	I	S	S	R
<i>R. solanacearum</i>	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R
<i>Salmonela 86E</i>	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S		R
<i>S. choleraesuis</i>	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
<i>X. axonopodis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

A-amicacina; AM- ampicilina; CF-cefoxitina; TRI-Trimetropim; CL- cloranfenicaol; ERI-eritromicina; GEN-gentamicina; NOR- norfloxacina;; PEN- penicillina, TET-tetraciclina; VAN- vancomicina

O isolado *Streptomyces* 1S foi cultivado em diferentes meios, minerais e orgânicos, sob diferentes condições de temperaturas para avaliar o crescimento e a produção de metabolitos bioativos, Na tabela 3 é possível avaliar a atividade antimicrobiana dos metabólitos produzidos pelo isolado 1S em quatro diferentes meios de cultivo a temperatura de 28 °C. Dos meios empregados, o ISP2 mostrou-se mais efetivo para o crescimento e a síntese de compostos com atividade antimicrobiana. Nesta condição foi observada inibição de seis, dos nove microrganismos teste empregados neste estudo.

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

	Meio AC	Meio B	Meio ISP2	Meio S
--	---------	--------	-----------	--------

<i>B. subtilis</i>	11	0	22	11
<i>S. aureus</i>	14	14	26	15
<i>S. pyogenes</i>	13	15	25	20
<i>E. coli</i>	0	0	16	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	13	0
<i>C. albicans</i>	0	0	14	0

Considerando-se as diferentes temperaturas, a 30 °C foi observada inibição de *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 o meio de cultura. Os melhores resultados foram atingidos em 96 horas de cultivo e no meio ISP2. A inibição de *E. coli* foi verificada após 72 horas de cultivo. Diferentes trabalhos têm reportado a resistência de bactérias Gram negativas aos produtos bioativos, especialmente *E. coli*, cuja inibição, quando ocorre, é mais tardiamente se comparada a inibição de bactérias Gram positivas (Fguira, 2005 Charoensoharat et al, 2008). Oskay et al. (2009) detectaram inibição de *E. coli* a partir de 32 horas. Resultados similares foram reportados por Hassan et al. (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 de temperatura de incubação foi observado a 35 e 40 °C atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *S. pyogenes*, somente em três dos



sete meios testados, com halos de inibição de 12 a 13 mm de diâmetro. As amostras que apresentaram atividade foram os cultivos de 48 e 96 horas respectivamente.

Nos ensaios de produção foi possível avaliar a influência dos diferentes meios de cultura e temperatura de incubação na produção dos compostos bioativos. Neste trabalho a influência foi bastante significativa. Avaliando os resultados obtidos nestes experimentos, verificou-se que à medida que ocorre um aumento na temperatura de incubação, foi observado uma redução no diâmetro dos halos de inibição e/ou ausência destes. Este comportamento nos permite inferir que a temperatura é um dos fatores limitantes para a produção dos compostos com atividade antimicrobiana. Resultados similares foram observados por Hassan et al (2001) onde 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 mostrou-se mais efetivo para induzir a produção de metabólitos bioativos nas condições testadas. Diferentemente, Sahla 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. Atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* tem sido avaliada em diferentes temperaturas, em sua maioria, a 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 et al., 2001, Sathi et al., 2001, Fguira, 2005, El-Naggar, 2006, Charoensoharat et al., 2008, Koch & Loffler, 2009).

Para avaliar o efeito do tempo de incubação e um maior espectro de atividade o isolado 1S foi cultivado em meio ISP2 por 168 horas a 28 °C. A atividade antimicrobiana determinada contra 17 microrganismos em intervalos de 24 horas, bem como o pH e a biomassa. A atividade antagônica dos extratos do isolado 1S nos diferentes tempos de cultivo pode ser observada na tabela 4. O isolado inibiu quinze dos 17 microrganismos testados. Atividade antagônica contra *P. thomiii* e *T. mentagrophyte* não foi observada em nenhuma das condições de cultivo empregadas.

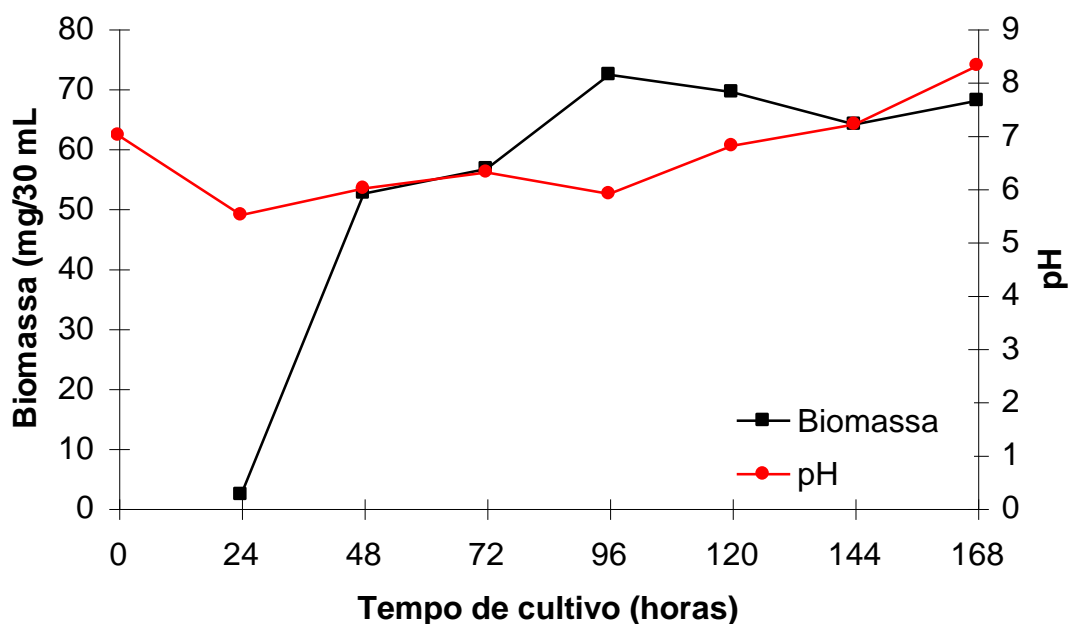
De maneira geral, as bactérias Gram positivas e Gram negativas foram inibidas com o sobrenadante resultante do cultivo de 24 horas (Tabela 4). A inibição de *Ralstonia*, *C. albicans* e *F. oxysporum* somente foi observada nas 48 horas de crescimento, enquanto que *Enterococcus faecium* e *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) foram inibidos mais tardiamente, a partir das 96 horas de cultivo. A atividade antagônica 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 (Figura 1). A composição do meio de cultura que 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, onde melhor atividade antimicrobiana foi observada com 96 horas de incubação a temperatura de 28 °C. Narayana e Vijayalakshmi (2008) e Lee et al. (2005) verificaram atividade antimicrobiana a partir 48 e 96 horas, e com picos de máxima atividade em 120 e 336 horas respectivamente. Estes resultados refletem a diversidade deste grupo de microrganismos bem como a influência de diferentes parâmetros como meio de cultivo, fonte de carbono, nitrogênio e temperatura de cultivo sobre o crescimento e a síntese de metabólitos bioativos.

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

	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
<i>MRSA</i>	0	0	0	0	18	16	11	0

<i>S. pyogenes</i>	10	25	24	24	19	20	20	18
<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



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

Neste trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana na fração bruta, aquosa e orgânica onde foram empregados oito microrganismos teste. Nenhuma atividade foi detectada na fração orgânica e não houve diferença significativa entre os halos de inibição da fração bruta e da fração aquosa. Diferentemente do que tem sido reportado por outros trabalhos onde o acetato de etila tem sido empregado como solvente para a extração de antibióticos (Roy et al, 2006, Arasu, 2009)

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* tem sido reportadas como potenciais produtores de novos antibióticos e como agentes de biocontrole (Han et al., 2008, Anitha & Rebeeth, 2009, Koch and Loffler, 2009).

No ensaio de microdiluição, foram empregados cinco microrganismos teste (Tabela 5), destes, *S. pyogenes* foi mais sensível, apresentou um valor de MIC de 6.25 mg/mL. *S. aureus* (MRSA), *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* mostraram-se mais resistentes aos metabólitos, apresentaram um MIC de 25 mg/mL, o que foi confirmado pelo antibiograma e através do ensaio de difusão em poço. Resultado similar foi encontrado por EL-Naggar et al. (2006), onde a concentração inibitória mínima para *E. coli* e *C. albicans* foi de 50 e 25 mg/mL respectivamente. Em nosso estudo, foi detectada forte atividade contra MRSA

(MIC 25 mg/mL) quando comparado com os resultados encontrados por Higginbotham e Murphy (2006), que encontraram 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 a temperatura 80 °C, drástica redução foi observada a temperatura de 90 °C onde somente 30% de atividade foi detectada e esta cessou após 15 minutos de esterilização. Malik et al. (2008) e Augustine (2007) obtiveram resultados similares, onde foi observada perda parcial ou total da atividade antimicrobiana em temperatura superior a 100 °C.

**Tabela 5.** Valor da concentração inibitória mínima, determinada pelo método de microdiluição, da fração aquosa, proveniente do cultivo do isolado *Streptomyces* sp. 1S em meio ISP2, a temperatura de 28 C durante 96 horas de crescimento.

Microrganismo teste	MIC (mg/mL)
<i>S. aureus</i> (MRSA) ATCC 33591	25
<i>S. pyogenes</i> ATCC 8668	6.25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15422	25
<i>S. Enteritides</i>	25
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	25

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que o isolado 1S é um potencial produtor de novos metabólitos bioativos, especialmente porque estes compostos não foram passíveis de extração com solvente orgânico comumente empregado e pelo espectro de ação com forte atividade antagônica, inibindo microrganismos multiresistentes de grande interesse clínico como *S aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium*, *Salmonella* Enteritidis e microrganismos fitopatogênicos. Assim, a identificação, a purificação e caracterização dos metabólitos produzidos pelo isolado 1S são as próximas etapas a serem alcançadas.

## Referências

- Aitha, A., Rebeeth, M., In vitro antifungal activity of *Streptomyces griseus* against phytopathogenic fungi of tomato field Academic Journal of Plant Sciences , 3(2), 119-123, 2009.
- Al-Tai, A.; Kim, B.; Kim, S.B.; Manfio, G.P.; Goodfellow, M. *Streptomyces malaysiensis* sp. Nov., a new streptomycete species with rugose, ornamented spore. International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 1395 – 1402, 1999.

Augusti, G.R., Superti, S., Zavascki, A.D. Prevalencia de produção de beta-lactamases de espectro estendido em bacterimias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. *Scientia Medica*, 17 (4), 192-196, 2007.

Arasu, M.V., Duraipayan, V., Agashan, P., Ignacimuthi. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (india) *Journal de Mycologie Médicale*, 19, 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*, 21, 107-114, 2005.

Oskay, M. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains *African Journal of Biotechnology*, 8(13) 3007-3017, 2009.

Andriole, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 44, 151 – 161. 1999.

Augustine, S.K., Bhavsar, S.P., Kapadnis, B.P. A non-polyen antifungal antibiotic from *Streptomyces aldidoflavus* PV23. *J Biosci*, 30 (2), 201-211, 2005.

Bachiega, G. L.; Vilegas, W.; Ujikawa, K. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada*, 26 (1), 29 – 37, 2005.

Charoensopharat, K., Thummabenjapone, P., Sirithorn, P., Tammasiriak, S. An antibacterial substance produced by *Streptomyces* sp. N 87 *African Journal of Biotechnol*, 7 (9), 1362-1368, 2008.



El-Naggar, M.Y., Kisinostatin, a major secondary metabolite isolated from the culture filtrate of *Streptomyces violaceusniger* strain HAL64

Fguira, L.F., Fotso, S., Ameer-Mehdi, R.B., Mellouli, L., Laatsch, H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Res Microbiol 156:341-347, 2005

Flårdh, K., Buttner, M. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nature, 7, 46-49, 2009.

Gava, C. A. T., Pereira, J. C.; Fernandes, M. C.; Neves, M. C. P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. Pesq. Agropec. Bras., 37 (10), 1373 – 1380, 2002

Han, J.H., Hwang, I.C., Cho, S.H., Jang, C., Kin, N.G., Yu, S.H., Kim, S.B. Description of *Streptomyces neopeptinius* sp. Nov, an actinobacterium with broad spectrum antifungal activities. The Journal Of Microbiology, 46 (3), 295-299, 2008.

Hassan, M.A., El-Naggar, Y., Said, W., Physiological factors affecting the production of a antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in bath cultures. Egyptian Journal of Biology, 3, 1-10, 2001.

Higginbotham, S.J. and Murphy, C.D. Identification and characterization of *Streptomyces* sp isolate exhibiting activity against methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiological Research, 2006.

Jevitt, L.A., Smith, A.J., Williams, P.P., Raney, P.M., McGowan, J.E., Terover, F.C. In vitro activities of daptomycin, linezolid and quinupristinadalfopristina against a

challenging panel of *Staphylococcus* and *Enterococci*, including vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *Microbial Drug Resistance*, 9(4), 389-394,

Koch, E., Löffler, I. Partial characterization of the antimicrobial activity of *Streptomyces antimycoticus* FZB53. *J. Phytopathol*, 157,235-242, 2009.

Li, W.; Lanoot, B.; Zhang, Y.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Liu, Z. *Streptomyces scopiformis* sp. nov., a novel streptomycete with fastigiated spore chain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1629– 1633, 2002.

Li, F., Maskey, R.P., Qin, S., Sattler, I., Fiebig, H.H., Maier, A., Zeeck, A., Laatsch, H. Chinikomycins A and B: Isolation, structure, elucidation and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. Isolale M045. *J Nat Orod*, 68. 349-353, 2005.

Macovei L, Zurek L Influx of enterococci and associated antibiotic resistance and virulence genes from ready-to-eat food to the human digestive tract. *Appl Environ Microbiol* ,73,6740–6747,2007

Malik, ., Sur, B., Singhal, N., Bihar, V. Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46, 254-257, 2008.

NCCLS International Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference methods for broth microdilution, 2002.

Ouhdouch, Y.; Barakete, M.; Finance, C. Actinomycetes of Moroccan habitats. Isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Soil. Biol.*, 37, 69 – 74, 2001.

Oskay, M. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains African Journal of Biotechnology, 8(13) 3007-3017, 2009.

Oskay, M. Tamer, A.U.; Azeri, C. Antibacterial of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Bacteriology*, 3 (9), 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 a antibacterial antibiotic. *African Journal of Biotechnology*, 4 (9), 909 – 910., 2005.

Sader, H.S., Jones, R.N., Andrade-Balocchi, S.A., Biendenbch, D.J., Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptobility patterns of bacteria from bloodstream infestions an Latina America medical centers. *Diagnostic Microbiology and infectious Disease*, 44, 213-280, 2003.

Sahin, N. and Ugur, A. Investigation of the antiomicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. *Turk J Biol*, 27, 79 – 84, 2003.

Salh, H.M., Al-Zahrani, Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. Isolated from Jazan JKUS Sci, 19, 127-138, 2007.

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.

Shiomi, K.; Hatae, K.; Hataro, H.; Matsumob, A.; Takahashi, Y.; Jiang, C.L.; Tomoda, H.; Kobayashi, S.; Tanaka, H.; Omura, S. A new antibiotic, actomicyna A<sub>9</sub> produced by *Streptomyces* sp. K01 – 0031. The Journal of Antibiotics, 58 (1), 74 – 78, 2005.

Thakur, D., Yadav, A., Gogoi, B.K., Bora, T.C. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. J. Mycol. Médicale, 17, 242-249, 2007.

Xu, L.H.; Jiang, Y.; Li, W. J.; Wen, M.L.; Li, M. G.; Jiang, C. L. *Streptomyces roseoalbus* sp. nov., an actinomycete isolated from soil in Yunnan, China. Antonie van Leeuwenhoek, 87, 189 – 194, 2005.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

Para a realização deste trabalho foram empregadas 25 isolados de *Streptomyces* provenientes de leiras de compostagem previamente identificados em nível de gênero e pertencentes à bacterioteca do laboratório de Microbiologia (Oliveira et al., 2004).

A caracterização dos isolados foi realizada por análises morfológicas como presença de substrato aéreo, e substrato sobre o micélio, arranjo de cadeia de esporos e produção de pigmentos difusível conforme Willians et al (1989) e Shirling e Gottlieb (1966).

Dos 25 isolados de *Streptomyces* empregados neste estudo 54% apresentaram micélio aéreo de cor cinza, 16,7% apresentaram micélio de coloração amarela e verde e 12,5% apresentaram micélio de cor branca em meio ISP5. O arranjo de cadeia de esporos predominante foi tipo espiral com 63,6% dos isolados, seguido do tipo flexuoso e reticuliapertum com 22,7% e 13,7% respectivamente. Resultados similares foram encontrados por Saadoun e Gharaibeh (2003) que observaram o predomínio de isolados com micélio cinza (33%) e branco (33%), e isolados com cadeia de esporos do tipo espiral e do tipo rectonoflexível.

Para corroborar com a identificação morfológica foi empregada a Reação em Cadeia da Polimerase com dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, StrepB e Strep F específicos para o gênero *Streptomyces* e o par de oligonucleotídeos pA e pf, proposto por Edwards et al (1989). Todos os 25 isolados de *Streptomyces*

apresentaram amplificação com os dois pares de oligonucleotídeos, sendo observados os produtos de amplificação com tamanho esperado de 1074 e 1030 pb respectivamente, que confirmou com a identificação em nível de gênero realizada através das características morfológicas. A digestão dos produtos amplificados com o par de oligonucleotídeos StrepB/StrepF com a endonuclease *Xho* II gerou dois fragmentos (567 e 507bp) para os 25 isolados, confirmou a identificação do gênero *Streptomyces*, como descrito por Rintala et al (2001). A digestão do fragmento de 1030 pb com a endonuclease *Ban* III gerou mesmo perfil de fragmentos para todos os isolados. No entanto, a digestão do fragmento de 1030 pb com a enzima *Hha* I gerou cinco diferentes perfis, com quatro fragmentos cada, sendo dois perfis únicos, no entanto os perfis de fragmentos gerados não foram suficientes para diferenciar os isolados

O tratamento com enzima *Hha* I tenha gerado diferentes perfis, este não foi muito discriminatório como os polimorfismos observados com outros marcadores como RAPD, BOX , DGGE, e PFGE. (Martin et al., 2000, Park & Kilbane, 2006). Lannot et al. (2004) avaliaram seqüências BOX de 451 espécies validadas, e verificaram 350 perfis únicos, e 75 linhagens foram consideradas sinônimas.

Os 25 isolados de *Streptomyces* foram caracterizados em relação ao seu potencial contra 53 microrganismos teste. Dos 25 isolados de *Streptomyces* empregados neste estudo, 80% apresentaram atividade antimicrobiana, destes 90% apresentaram atividade antibacteriana e 45% apresentaram atividade

antifúngica. Cerca de 35% dos isolados com atividade antimicrobiana inibiram bactérias e fungos simultaneamente.

Em nosso estudo, dos *Streptomyces* que apresentaram atividade antimicrobiana 100% inibiram bactérias Gram positivas e somente 55,6% inibiram bactérias Gram negativas. Sajid et al. (2009) e Saadoun e Gharaideh (2003) encontraram resultados similares, onde todos os isolados com atividade antimicrobiana foram capazes de inibir bactérias Gram positivas.

A resistência dos microrganismos a diferentes classes de antibióticos tem sido atribuída à resistência intrínseca e a resistência adquirida. Bacilos Gram negativos apresentam resistência intrínseca a macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas (MLS) devido à baixa permeabilidade da membrana externa aos MLS. Microrganismos Gram positivos por sua vez, adquirem genes de resistência ,que acarretam modificação do sítio ativo, hidrólise da estrutura do antibiótico e sistemas de efluxo como os genes *mrs* e *vga* (Romanatto et al., 2005) .

Aminoglicosídeos como amicacina, estreptomicina e gentamicina são comumente empregados no tratamento de infecções por microrganismos Gram positivos e Gram negativos. Bactérias, especialmente Gram negativas desenvolveram sistemas para a modificação do sítio ativo a partir da produção de enzima como aminoglicosídeo acetiltransferase (AAT), adeniltransferase (ANT) e fosfatotransferases (APH). A resistência a betalactâmicos, na sua maioria, também está associada a produção de enzimas que hidrolisam o antibiótico, como

as betalactamases de espectro estendido, reportadas em diferentes gêneros bacterianos (Sader et al., 2003, Romanatto et al., 2005, Augusti et al., 2007).

Atividade antifúngica foi observada em 36% dos isolados de *Streptomyces*, resultados similares foram encontrados por outros autores assim como a maior suscetibilidade de *C. albicans* e *F. oxysporum* (Rizk et al., 2007, Oskay et al., 2009).

Dos nove isolados que apresentaram atividade antifúngica, com exceção, do isolado 1S que inibiu 16 fungos testados, os demais isolados de apresentaram pequeno espectro de ação inibindo de um a quatro fungos.

Dos 53 microrganismos teste empregados neste estudo, 35,8% foram inibidos somente pelo isolado 1S (dez bactérias Gram negativas, duas leveduras e sete fungos filamentosos). Todas as dezessete bactérias Gram positivas e dezesseis Gram negativas foram inibidas pelo menos por um isolado de *Streptomyces*. Dos vinte fungos testados, apenas *Candida glabrata*, *Microsporium gypseum* e *Rhizoctonia* foram resistentes aos metabólitos produzidos pelos 25 isolados de *Streptomyces*.

Dos microrganismos Gram positivos empregados neste estudo *Enterococcus* foi um dos que apresentou menor susceptibilidade/maior resistência, sendo inibido por 24% dos isolados de *Streptomyces*.

*Enterococcus* são patógenos oportunistas e considerados um dos mais importantes microrganismos Gram positivos associados ao desenvolvimento de



infecções nosocomiais. Estes microrganismos apresentam resistência a uma ampla variedade de antibióticos empregados na terapia humana. Riboldi et al. (2005) reportaram a alta resistência dos *Enterococcus* sp (37,8%) a aminoglicosídeos. A resistência a gentamicina foi observada em 24,8% dos isolados.

Entre os glicopeptídeos empregados no tratamento de diferentes infecções por microrganismo Gram positivos estão a vancomicina e a teicoplanina. A resistência a vancomicina foi reportada no Brasil na segunda metade da década de 90. O aumento da resistência e a disseminação do fenótipo VanA, VanB e VanC têm sido reportados. O fenótipo mais comum é o VanA, porém mais recentemente tem sido reportados os fenótipos VanD e VanE (Romanatto et al., 2005). Em virtude da grande resistência a vancomicina, tratamento alternativo empregando os antibióticos teicoplanina, daptomicina e combinações de beta-lacâmicos e glicopeptídeo com um aminoglicosídeo tem sido empregado na terapia humana, o que tem resultado no aumento da resistência a gentamicina e estreptomicina (D' Azevedo et al, 2005).

Em nosso estudo foi avaliada a produção de compostos bioativos contra dez cepas de *Enterococcus* multiresistentes. Nos ensaios de produção, dois meios de cultivo foram empregados para avaliar a atividade antagônica de *Streptomyces* contra *Enterococcus* sp. Dos seis isolados de *Streptomyces* avaliados, três apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram atividade antimicrobiana em todos os extratos testados (fração bruta, aquosa e orgânica).

O meio amido caseína mostrou-se melhor para a produção de metabólitos bioativos, nas condições testadas. A separação parcial, dos compostos obtidos do crescimento do isolado *Streptomyces* sp. 50, por cromatografia em camada delgada, permitiu observar duas frações ativas contra *E. faecium*, com valor de Rf de 0,3 e 0,13. Embora a fração orgânica e a fração bruta deste mesmo isolado, e de outros, tenham apresentado atividade antimicrobiana pela técnica da difusão em poço, a mesma não foi detectada através da autobiografia. É possível que os compostos estejam em concentrações abaixo da concentração inibitória mínima, uma vez que o volume empregado nesta técnica é dez vezes menor que do volume usado no teste de difusão, ou a atividade antimicrobiana poderia ser resultado da ação sinérgica de diferentes compostos, que podem migrar de forma diferente na cromatografia. Porse e Garret (1999) demonstraram a ação sinérgica das estreptograminas (Virginiamicina e pristinamicina) sob a inibição da síntese protéica da mesma maneira, a ação sinérgica e a coprodução de antibiótico betalactâmicos e ácido clavulânico é reportada a mais de trinta anos por diferentes espécies de *Streptomyces* (Jensen & Paradkar, 1999).

Estes resultados preliminares indicam uma parcial separação dos compostos bioativos produzidos pelo isolado 50, sendo necessários estudos posteriores para caracterização destes.

Nos ensaios de microdiluição, os extratos dos isolados 3S, 48 e 50 provenientes do cultivo em meio amido caseína apresentaram um MIC de 15

mg/mL, enquanto que nos obtido do cultivo em ISP2 foi observado o valor de MIC de 30 mg/mL.

Os resultados obtidos na cromatografia em camada delgada e nos ensaio de microdiluição não permitiram avaliar se os isolados 48 e 50 produziram diferentes compostos nos diferentes meios de cultivo. No entanto, podemos inferir que os metabólitos detectados nas diferentes frações (frações orgânica e aquosa), produzidos por um isolado, possam ser compostos antimicrobianos diferentes, uma vez que estes foram separados conforme sua afinidade pelo solvente empregado.

Dos dezoito isolados que apresentaram atividade antimicrobiana, oito destes apresentaram um amplo espectro de atividade antimicrobiana. Em nosso trabalho, o isolado *Streptomyces sp.* 1S foi selecionado para estudos de produção, pois apresentou o maior potencial de antagonismo inibindo 46 microrganismos teste.

Diversos trabalhos têm avaliado a influência se diferentes fatores, físico, químicos, na produção de metabólitos ativos por *Streptomyces*. Estes trabalhos demonstram que a temperatura, o tempo de crescimento e meio de cultura influenciam diretamente a produção de metabólitos bioativos (Sathi et al., 2001, Sultan, 2002, Mondol, 2005, Oskay, 2009).

Nos ensaios de produção com o isolado 1S foram testados sete meios de cultura e quatro temperaturas de incubação. Em todos os meios de cultivo houve o crescimento do isolado, no entanto, embora tenha sido observado maior

biomassa, no cultivo em meio TSB, nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada pela técnica de difusão em poço. Nos cultivos a temperatura de 30, 35 e 40 °C foi observada inibição dos microorganismos *S. aureus*, *S. pyogenes* e *B. subtilis*.

Os ensaios de produção em meio ISP2 e na temperatura de 28 °C mostrou ampla inibição de microrganismos incluindo bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. As frações bioativas foram concentradas com solvente acetato de etila, no entanto nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada nesta fração. Os metabólitos produzidos por diferentes espécies de *Streptomyces* apresentam estrutura molecular diversa, o que reflete sua maior ou menor afinidade por determinado solvente orgânico. Diferentes trabalhos de purificação e caracterização de antibióticos tem reportado o emprego de diversos solventes orgânicos, polares e não polares como acetato de etila, clorofórmio, butanol, metanol e hexano, para a extração destes (Roy et al., 2006, Ilic et al., 2007). Em nosso trabalho a extração com acetato de etila, clorofórmio e diclorometano não permitiram a extração dos metabólitos bioativos. Os metabólitos com atividade antimicrobiana, permaneceram na fração aquosa. Estes resultados demonstram que os metabólitos bioativos produzidos pelo isolado 1S são altamente polares. Higginbotham e Murphy (2008) observaram resultados similares com *S. globosus*, que produziu um antibiótico solúvel em água e com amplo espectro de atividade. As propriedades dos metabólitos produzidos sugerem que estes possam ser pertencentes a classe dos aminoglicosídeos.

Nos ensaios de cultivo em cultura estática, nenhuma atividade antagônica foi observada até 240 horas de cultivo. Os melhores resultados de atividade antimicrobiana foram observados em 48 e 96 horas de cultivo.

Os metabolitos produzidos mantiveram 100% da atividade antimicrobiana após incubação a temperatura de 80 °C.

A concentração inibitória mínima foi determinada com o extrato aquoso para *S. pyogenes*, *MRSA*, *E coli*, *Salmonella Enteritidis* e *C. albicans*. O MIC para *S. pyogenes* foi de 6,25 mg/mL e de 25 mg/mL para os demais microrganismos.

Em nosso trabalho, dois isolados de *Streptomyces* foram selecionados como potenciais produtores de metabólitos bioativos, isolado 1S e 50. Estes microrganismos foram caracterizados através de análises morfológicas, provas bioquímicas, fisiológicas e biologia molecular. As sequências parciais da região 16S do DNA ribossomal dos isolados 1S e 50 foram comparadas com todas as sequências disponíveis empregando o programa BLAST. *Streptomyces* sp 1S apresentou similaridade de 96% com *S. diastaticus* e *Streptomyces* sp 50 apresentou máxima similaridade, de 92%, com *S. themocoprophilus*. Embora a análise parcial da região 16S do rDNA tenha apresentado relativa similaridade destes isolados com outras espécies já reportadas, as informações referentes às características morfológicas e bioquímicas diferem significativamente. Assim, para uma identificação em nível de espécie será necessário a análise total da região 16S rDNA, ou outras análises que permitam distinguir entre as diferentes espécies de *Streptomyces* como análises de ácidos graxos e melaquinonas.

Estudos de produção de metabólitos bioativos por espécies de *Streptomyces* têm sido extensivamente avaliados (Hassan et al., 2001, Asagbra et al., 2005, Takur et al., 2009). Diferenças significativas tem sido observadas entre a avaliação da atividade antimicrobiana pela técnica da sobrecamada e pela técnica de difusão, empregando a cultura sobrenadante. Estas diferenças têm sido atribuídas a menor difusão dos metabólitos bioativos em meio de cultura sólido, as baixas concentrações detectadas nas culturas filtradas e a hidrólise destes metabólitos em cultura líquida (Nkanga & Haqedorn, 1978, Anibou et al., 2008). A redução ou perda da atividade antimicrobiana destes microrganismos pode ser resultante da grande instabilidade genética, através de grandes deleções nas regiões terminais (Volf & Leblond, 2000, Chen et al., 2002).

Os resultados deste trabalho demonstram que os isolados de *Streptomyces* provenientes de processo de compostagem apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana, o que pode ser observado não somente pelo número, mas também pela diversidade de microrganismos teste inibidos. Este estudo preliminar demonstrou o promissor potencial destes microrganismos. Para que estes metabólitos bioativos e/ou os próprios microrganismos possam ser empregados, novas pesquisas são necessárias para purificação, caracterização, elucidação da estrutura destes compostos, bem como seu mecanismo de ação e farmacocinética assim como a identificação dos isolados produtores .

## REFERÊNCIAS

ALANIS, A.J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic Era? **Archives of Medical Research**, vol. 36, p. 697-705, 2005.

ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., SARTORIO, R.C., BIROH, D.H.B., SILVA, R.R., LAI, D., VANETTI, C.A. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de Eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 31 (4), p. 357-366, 2006.

ANDERSON, A.S. AND WELLINGTON, E.M.H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera . International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 51, p. 797-814, 2001.

ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 44, p. 151-161, 1999.

AITHA, A., REBEETH, M., In vitro antifungal activity of *Streptomyces griseus* against phytopathogenic fungi of tomato field **Academic Journal of Plant Sciences** , vol. 3(2), p. 119-123, 2009.

ATALAN, E., MANFIO, G.P., WARD, A.C., KROPPENSTEDT, R.M., GOODFELLOW, M. Biosystematic studies on novel *Streptomyces* from soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 77 , p. 337-353, 2000.

AUGUSTI, G.R., SUPERTI, S., ZAVASCKI, A.D. Prevalencia de produção de beta-lactamases de espectro estendido em bacterimias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Scientia Medica**, vol. 17(4), p. 192-196, 2007.

AUGUSTINE, S.K., BHAVSAR, S.P., KAPADNIS, B.P. A non-polyen antifubgal antibiotic from *Streptomyces aldidoflavus* PV23. **Journal of Biosciences**, vol. 30 (2), p. 201-211, 2005.

BARRET, C.T & BARRET J. Antibacterials.Are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 14, p. 621-626, 2003.

BERDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, vol. 58 (1), p. 1-26, 2005.

BIBB, M.J. Regulation of secondary metabolism in Streptomycetes. **Current Opion in Microbiology**, vol. 8, p. 208–215, 2005.

BOUIZAGARNE, B., HADRAM, I.E., OUHDOUCH, Y. Novel production of isochanin by a strain *Streptomyces* sp. Isolated from rhizosphere soil of the indegenous Moroccan plant Anagania Spirosal. **World Journal of Microbiology and Buiotechnology**, vol. 22, p. 423-429, 2006.

BRAUTASET, T., SEKUROVA, O.N., SLETTA, H., ELLINGSEN, T.E., STROM, A.R., VALLA, S., ZOTCHEV, S.B. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nistatin im *Streptomyces norsei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. **Chemistry & Biology**, vol. 7 (6), p. 394-403.

CASTILLO, U.F., STROBEL, G.A., FORD, E.J., HESS, W.M., PORTER, H., JENSEN, J.B., ALBERT, H., ROBISON, R., CONDRON, M.A.M., TELOW, D.B., STEVENS, D., YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, vol. 148, p. :2675-2685, 2002.



Cao, L., Qiu, Z., You, J., , H., Zhous, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonistic of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banan roots. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 247, p. 147-152, 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**, vol. 100, p. 14555-14561, 2003.

CHARAN, R.D., SCHLINGHAM, G., JANSOU, BERNAN, V., FENG, X., CARTER, G.T.. Diazepinomicin. Aew antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp. **Journal of Natural Products**, vol. 67 (8), p. 1431-1433, 2007.

CHEN , C.W., HWANG, C.H., LEE, H.H., TSAI, H.H., KIRBY, R. Once the circle has been broken:dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes . **Trends in Genetics**, vol. 18 (10), p. 522-529, 2002.

CHOPRA, I. & ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications. Molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 65 (92), p. 232-260, 2001.

CLAESSEN, D., JONG, W., DIJKHUIZEN, L., WÖSTEN, H.A.B.. Regulation of *Streptomyces* development:reach for the sky!**Trends in Microbiology**, vol. 14 (7), p. 313-319, 2006.

COUTIER, MJ. Antibiotics:Mechanisms of action and the acquisition of resistance – When magic bullets lose ther magic. **American Journal of Pharmaceutical Education**, vol. 59, p. 167-172, 1995.

COWEN, L.E., ANDERSON, J.B. AND KOHN, L.M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, vol. 56, p. 139-165, 2002.

CUNDLIFFE E. Antibiotic production by actinomycetes: the janus face of regulation.**Journal of .Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 33, p. 500-506, 2006.

DANILENKO, V.N., MIRONOV, V.A., ELIZAROV, S.M.. Calcium as a regulator of intracellular processes in actinomycetes a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, vol. 41 (4), p. 319-329, 2005.

DEMAIN, A.L. Induction of micorbial secondary metabolism **International Microbiology**, vol. 1, p. 259-264, 1998.

DIEKEME, D.I. AND JONES, R.N. Oxazolidinons: a review. **Drugs**, vol. 59 (1), p. 7-16, 2000.

DIETZ, A. AND MATEWS, J. Classification of *Streptomyces* spore surface into five groups, **Applied Microbiology**, vol. 2 (3), p. 527-533, 1971.

DUARTE, V., DEBOE, S.H., WARD, L.J., DEOLIVEIRA, A.M.R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing black of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 96, p. 535-545, 2004.

EL-NAGGAR, M.Y., Kisinostatin, a major secondary metabolite isolated from the culture filtrate of *Streptomyces violaceusniger* strain HAL64, 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**, vol. 38(7), p. 1505-1520, 2006.

EL-SHALOURY, S.A., EL-SHENAWY, N.A., EL-SALAN, I.M.A. Antimicrobial, antitumoral and in vivo cytotoxicity of actinomycetes inhabiting marine shellfish. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 25, p. 1547-1555, 2009.

EL-TASSA, V. AND DUARTE, V. Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através do PCR-RFLP do gene recA. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 31 (1), p. 23-28, 2006.

EMBRAPA Acesso <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/#centeiio>

Enright. M.L. The evolution of a resistant pathogen the case of MRSA. **Current Opinion in Pharmacology**, vol. 3, p. 474-479, 2003.

Euzeby, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature <http://www.bacterio.cict.fr> Acesso 31 outubro 2009.

EZRA, D., CASTILHO, U.F., STROBEL, G.A., HESS, W.M., PORTER, H., JENSEN, J.B., CONDRON, M.A.M., TEPLow, D.B., SEARS, J., MARANTA, M., HUNTER, M., WEBER, B., YAVER, D. Coronamycin, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. Endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, vol. 150, p. 785-793, 2004.

FGUIRA LF, FOTSO S, AMEUR-MEHDI RB, MELLOULI L, LAATSCH H Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of

newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. **Resource Microbiology**, vol. 156, p. 341-347, 2005.

FISCHBACH, M.A., WALSH, C.T. antibiotic for emerging pathogens. **Science**, vol. 325 (916), p. 1089-1093, 2009.

FLÄRDH, K. & BUTTNER, M. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature**, vol. 7, p. 46-49, 2009.

FLÄRDH, K. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 6, p. 564-571, 2003.

GALES, S.A., SADER, H.S., JONES, R.N. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonie in Latina America frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY antimicrobial Surveillace Program (1997-2000) **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol.44, p. 301-311, 2002.

GALES, A.C., SADER, H.S., MENDES, R.E., JONES, R.N., *Salmonella* spp isolates causing bloodstream infections in Americ: report of antimicrobial activity from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, vol. 44, p. 313-318, 2002.

GAVA, C. A. T.; PEREIRA, J. C.; FERNANDES, M. C.; NEVES, M. C. P.. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa em Agropecuária Brasileira**, vol. 37 (10), p. 1373 – 1380, 2002.

GAYNOR, M. & MANKIN, A. Macrolide antibiotic: Binding site, mechanism of action, resistance. **Forntiers in Medicinal Chemistry**, vol. 2, p. 21-35, 2005.

GRAHAM, J.H., GOTTWALD, R., CUBERO, J., ACHOR, A.S. *Xanthomonas axonppodis* pv. *citri*: factors affecting sucessfull eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, vol. 5 (11), p. 1-15, 2004.

GULLO, V.P., MCALPINE, J., LAM, K.S., BAKER, D., PETERSEN, F. Drug discovery from natural products. **Journal Industrial Microbiology and Biotecnology**, vol. 33, p. 523-531, 2006.

GUPTE, M., KULKARNI, P., GANGULI, B.N., Antifungal antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 58, p. 46-57, 2002.

HAN, J.H., HWANG, I.C., CHO, S.H., JANG, C., KIN, N.G., YU, S.H., KIM, S.B. Description of *Streptomyces neoepitinius* sp. nov, an actinobacterium with broad

spectrum antifungal activities. **The Journal of Microbiology**, vol. 46 (3), p. 295-299, 2008.

HASSAN, M.A., EL-NAGGAR, Y., SAID, W., Physiological factors affecting the production of a antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in bath cultures. **Egyptian Journal of Biology**, vol. 3, p. 1-10, 2001.

HWANG, B.K., LIM, S.W., KIM, B.S., LEE, J.Y., MOON, S.S. Isolation and In vivo and In vitro antifungal activity of phenyl acetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 67 (8), p. 3739-3745, 2007.

IMADA, C. Enzyme inhibitors and other bioactive compound from marine actinomycetes. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol 87, p. 59-63, 2005.

JENSEN S.E. & PARADKAR, A.S. Biosynthesis and Molecular Genetics of Clavulanic. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 75 (1-2), p. 125-133, 1999.

JEVITT, L.A., SMITH, A.J., WILLIAMS, P.P., RANEY, P.M., MCGOWAN, J.E., TEROVER, F.C. In vitro activities of daptomycin, linezolid and quinupristinadalfopristin against a challenge panel of *Staphylococcus* and *Enterococci*, including vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* **Microbial Drug Resistance**, vol. 9(4), p. 389-394, 2003.

KALTENPOTH, M., GOETTLER, W., DALE, C., STUBBLEFIELD, J.C., HERZNET, G., MUELLER, K.S., STROHM, E. "Candidatus *Streptomyces philanthi*" an endosymbiotic streptomycete in the antennae of *Philanthus digger* wasps. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 56, p. 1403-1411, 2006.

KANG, Y.S., LEE., Y., CHO, S.K., KIM, B.J., KIM, M., LIM, Y., CHO, M. Antibacterial activity of a disaccharide isolated from *Streptomyces* sp. strain JJ45 against *Xanthomonas* sp. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 294, p. 119-125, 2009.

KATAOKA, M., UEDA, K., KUDO, T., SEKI, T., YOSHIDA, T.. Application of variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. **FEMS Microbiol Letters**, vol. 151, p. 249-255, 1997.

KERN, W.Y. Daptomycin: first in a new class of antibiotic for complicated skin and soft-tissue infections. **International Journal of Clinical Pract**, vol. 60(93), p. 370-378, 2006.

KHAMN, S., YOKOTA, A., PEBERDY, J.F., LUMYONG, S. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. Isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants **International Journal of Integrative Biology**, vol. 6(3) p. 143-147, 2009.

KIM, H.J., LEE, S.C., HWANG, B.K. *Streptomyces cheonanensis* sp. nov., a novel *Streptomyces* with antifungal activity. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 56, p. 471-475, 2006.

KOCH, E. & LOFFLER, I. Partial characterization of the antimicrobial activity of *Streptomyces antimycoticus* FZB53. **J. Phytopathol**, 157,235-242, 2009.

KROTTA, L.P., HADDAD, J., MOBASHERY, S. Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 44 (12), p. 3249-3256, 2000.

KUMAR, J., HÜCKELHOVEN, R., BECKHORE, U., NAGARAJANS, S. KOGEL, K.H., **Phytopathology**, vol. 91, p. 121-133, 2001.

KUPFER, P. The family Streptomycetaceae: Part II. Taxonomy, **Prokaryotes** 3, p. 538-604, 2006.

KWANGWON, L., JOO, H.S., YANG, Y.H., SONG, E., KIN, B.G. Proteomics for *Streptomyces*; Industrial Proteomics” for antibiotics. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 16(3), p. 331-348, 2006

Laid, R.F., Sifour, M., Sakr, M., Hacene, H. A new actinomycete strain SK4-6 producing secondary metabolite effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* . **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 24, p. 2235-2241, 2008.

LANOOT, B., VANCANNEYT, M. DAWYNDT, P., CNOCKAERT, M., ZHANG, J., HUANG, Y., LIU, Z., SWINGS, J. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces* emended descriptions proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus*, *S. phaeropurpureus*. **Systematic and Applied Microbiology**, vol. 27, p. 84-92, 2004.

LEBLOND, P., FISCHER, G., FRANCOU, F.X., BERGER, F., GUÉRRINEA, M., DECARIS, B. The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 Kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA. **Molecular Microbiology**, vol. 19 (2), p. 261-271, 1996.

LECHEVALIER, H.A., LECHEVALIER, M.D. Biology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, vol. 21, p. 71-100, 1967.

LEWIS, M.T., GALES, A.C., SADER, H.S., PFALLER, A., JONES, R.N. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from Latin American patients with a diagnosis of pneumonia: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol. 37, p. 63-74, 2000.

LI, F., MASKEY, R.P., QIN, S., SATTLER, I., FIEBIG, H.H., MAIER, A., ZEECK, A., LAATSCH, H. Chinikomycins A and B: Isolation, structure, elucidation and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. Isolate M045. **Journal of Natural Products**, vol. 68, p. 349-353, 2005.

LOMBÓ, F., MENÉNDEZ, N., SALAS, J.A., MÉNDEZ, C. The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 73, p. 11-14, 2006.

MACOVEI L, ZUREK L Influx of enterococci and associated antibiotic resistance and virulence genes from ready-to-eat food to the human digestive tract. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 73, p. 6740–6747, 2007.

MAHADEVAN, B AND CRAWFORD, D.L. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC 108. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 20, p. 489-493, 1997.

MALIK, SUR, B., SINGHAL, N., BIHAR, V. Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Indian Journal of Experimental Biology**, vol. 46, p. 254-257, 2008.

MARTIN, J.F. & DEMAIN, A.L. Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiological Reviews**, vol. 44(2), p. 230-251, 1980.

MARTIN, J.F. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotic and other secondary metabolites mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. **Journal of Bacteriology**, vol. 186 (16), p. 5197-5201, 2004.

MARTIN, J.F. CASQUEIRO, J., LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites how producer cells send out messages of intercellular communication. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 18, p. 282-293, 2005.

MATTA, D.A., ALMEIDA, L.P., MACHADO, A.M., AZEVEDO, AC., KUSANO, E.J.U., TRAVASSOS, N.F., SALOMÃO, R., COLOMBO, AL. Antifungal susceptibility of 1000 candida bloodstream isolates to 5 antifungal drugs results of a multicenter study conducted in São Paulo Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol. 57, p. 399-404, 2007.

MEHDI, R.B.A.; SIOUD, S.; FGUIRA, L.F.B.; BEJAR, S.; MELLOULI, L. Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. **Process Biochemistry**, vol. 41, p. 1506-1513, 2006.

MEHLING, A., WEIHMEIER, U.F., PEIPERSBERG, A. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay in identifying conserved regions of actinomycetes genomes. **FEMS Microbiol Letters**, vol. 128, p. 119-126, 1995.

MEYERS, P.R., PORTER, D.S., OMOROGLE, C., PULE, J.M., KWETANE, T. *Streptomyces speibonae* sp. nov., a novel streptomycete with blue substrate mycelium isolated from south African soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 53, p. 801-805, 2003.

MICHEL, G.B., BUTAYE, P., CLOECKAERT, A., SCHWARZ, S. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella* update. **Microbes and Infections**, vol. 8, p. 1898-1814, 2006.

MONDOL, M.A.M. Antimicrobial screening of two serina analogues from *Streptomyces* species. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, vol. 8(7), p. 966-968, 2005.

MYLES, D.L. Novel biologically active natural and unnatural products. **Pharmaceutical Biotechnology**, vol. 14, p. 627-633, 2003.

NDONDE, M. J. M. & SEMU, E. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species from four Tanzanian soils and their antimicrobial potential against selected plant and pathogenic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 16, p. 595- 599, 2000.

NEDIALKOVA D. & NAIDENOVA M. Screening the Antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. **Journal of Culture Collection**, vol. 4, p. 29-35, 2005.

NKANGA, E.J. & HAGERDORN, C. Detection of antibiotic-producing *Streptomyces* inhabiting forest soils. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 14 (1), p. 51-59, 1978.

NUCCI, M. & COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol. 58, p. 77-82, 2007.

OBRITSCH, M.D., FISH, D.N., MACLARTEN, R., JUNG, R. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 48 (12), p. 4606-4610, 2004.

ÔMURA, S., IKEDA, H., ISHIKAWA, A., TAKAHASHI, C., SHINOSE, M., TAKAHASHI, Y., HORIKAWA, H., NAKAZAWA, H., OSONOE, T., KIKUCHI, H., SHIBA, T., SAKAKI, Y., HATTORI, M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* deducing the ability of producing secondary metabolites **PNAS**, p. 1-6, 2001.

OSKAY, M. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains **African Journal of Biotechnology**, 8(13) 3007-3017, 2009.

PARK, H.S., KILBANE, J.J. Rapid detection and high-resolution discrimination of the genus *Streptomyces* based on 16S-23S rDNA spacer region and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, vol. 33, p. 289-297, 2006.

PATERSON, D.L., KO, W.C., GOTTBURG, A.V., MOHAPATRA, S. CASELLA, J.M., GOOSSENS, H., MULAZIMOGLU, L., TRENHOLME, G., KLUGMAN, K.P., BONOMO, R.A., RICE, L.B., REIS, S.A., AOUSSATCHÉ, N., DAMASO, C.R.A. FK506, a secondary metabolite produced by *Streptomyces*, presents a novel antiviral activity against Orthopoxvirus infection in cell culture. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 100, p. 1373-1380, 2006.

PORSE, B. T., AND R. A. GARRETT. Sites of interaction of streptogramin A and B antibiotics in the peptidyl transferase loop of 23 S rRNA and the synergism of their inhibitory mechanisms. **Journal Molecular Biology**, vol. 286, p. 375-387, 1999.

REIS, A., COSTA, H., BOITEUX, L.S., LOPES, C.A First report of *Fusarium oxysporum* f sp. *Licopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 30(4), 426-428, 2008.



ROMANATTO, G., BOLZAN, V., ZANCH, A.C., D'AZEVEDO, P.A. Detecção Molecular da resistência bacteriana- Ênfase para Enterococcus e Streptococcus. **NewsLab**, p. 100-112, 2005.

RICHTER, M., WILLEY, J.M., SUBMUTH, R., JUNG, G., FIEDLER, H.P. Streptofactin , a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 163, p. 165-171, 1998.

RIFAAT, H.M., NASER, N.H.A.E., HELMY, S.M., ALI, A.M. Taxonomical studies on the ertein Streptomyces exhibiting antimicrobial activity isolated from Egyptian soils. **Journal of Culture Collections**, vol. 5, p. 25-34, 2007.

RIZK, M., ABDEL-RAHMAN, T., METWALLY, H. Screening of antagonistic activity in the different *Streptomyces* species agaisnt some pathogenic microrganisms **Journal of Biological Sciences**, vol. 7 (8), p. 1418-1423, 2007.

ROY , R.N., LASKAR, S, SEN, S.K. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2 **Microbiological Research**, vol. 161, p. 121-126, 2006.

RUSSO, T.A. & JOHNSON, J.R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*:focus on an increasingly import endemic problem. **Microbes and Infection**, vol. 5, p. 449-456, 2003.

SAINTPIERRE, D., AMIR, H.,PEAU, R., SEMBIRING, L., GOODFELLOW. *Streptomyces yatensis* sp. nov., a novel bioactive Streptomyces isolated from a new Caledonian ultramafic soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 83, p. 21-26, 2003.

SANCHEZ, S. AND DEMAIN A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Ezyme and Microbiology Technology**, 31, 895-906, 2002..

SAJID, I., YAO , C.B.F.F., SHAABAN, K.A., HASNAIN, S., LAATSH, H. Antifungal and antibacterial activities of indigenous *Streptomyces* isolates from saline farmlands: screening, rybotyping and metabolic diiversity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 25, p. 601-610, 2009.

SALH, H.M. & AL-ZAHRANI, Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. Isolated from Jazan JKUS **Sciences**, vol. 19, p. 127-138, 2007.

SANCHES, S. & DEMAIN, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbiology Technology**, vol. 31, p. 895-906, 2002.

SATHI, Z.S., RAHMAN, A.A., GAFUR, M.A. Identification and In vitro antimicrobial activity of a compound isolated from *Streptomyces* species. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, vol. 4 (12), p. 1523-1525, 2001.

SADER, H.S., JONES, R.N., ANDRADE-BALOCCHI, S.A., BIENDENBCH, D.J., Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infestions an Latin America medical centers. **Diagnostic Microbiology and infectious Disease**, vol. 44, p. 213-280, 2003.

SHIOMI, K.; HATAE, K.; HATARO, H.; MATSUMOB, A.; TAKAHASHI, Y.; JIANG, C.L.; TOMODA, H.; KOBAYASHI, S.; TANAKA, H.; OMURA, S. A new antibiotic, actomicyna A<sub>9</sub> produced by *Streptomyces* sp. K01 – 0031. **The Journal of Antibiotics**, vol. 58 (1), p. 74 –78, 2005.

SHIRLING, E.B. & GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic.and Bacteriology**, vol. 13, p. 313–340, 1966.

SHIRLING, E.B. & GOTTLIEB, D.,. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. V. Additional description. **Journal of Systematic and Bacteriology**, vol. 22, p. 265–394, 1972.

STACKEBRANDT, E AND SCHUMANN, P. Introduction to the Taxonomy of actinobacteria, **Prokaryotes**, vol. 3, p. 297-321, 2006

SULTAN, M.Z., KHATUNE, N.A., SATHI, Z.S., BHUIYAN, S.A., SADICK, M.G., CHOUDURY, A., GAFUR, M.A., RAHMAN, A.A. In vitro antibacterial activity of an active metabolite isolated from *Streptomyces* species. **Biotechnology**, vol. 1 (2-4), p. 100-106, 2002.

STRUELENS , M.C., DENIS, O., VILLALOBOS, H.R.. Microbiology of nosocomial infections:progress and challenges. **Microbes and Infection**, vol. 64, p. 1043-1048, 2004.

TAKANO, E.  $\gamma$  - butirolactones : *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation **Current Opinion in Microbiology**, vol. 9, p. 287-294, 2006.

TALMANI, V., POZZA, E.A., SOUZA, P.E., JUNIOR, D.C., CASTRO, H.A,SOUZA, R.M., ABREU, M.S. Dez anos da clínica fitossanitária da UFLA- frequência da ocorrência patógenos, sintomas e principais hospedeiros. **Ciência Agrotec. Lavras**, vol. 27 (1), p. 70-75, 2003.

TERKINA, I.A., PARFENOVA, V.V., AHN, T.S. Antagonistic activity of actinomycetes of Lake Baikal **Applied Biochemistry and Microbiology**, vol. 42 (2), p. 173-176, 2006.

TSENG, S.F., HUANG, T.W., CHEN, C.W., CHERN, M.K., TAM, M.F., TENG, S.C. ShyA, a membrane protein for proper septation of hyphae in *Streptomyces*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 343, p. 369-377, 2006.

VOLFF, J.N. & ALTENBUCHNER, J. A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 186, p. 143-150, 2000.

VOLLMER, W. The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 73, p. 37-47, 2006.

WAGENER, M.M., MCCORMACK, J.G., YU, V.L. International Prospective Study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended spectrum  $\beta$  lactamase production in nosocomial infections. **Annual International Medical**, vol. 140, p. 26-32, 2004.

WANG, J., SOISSON, S.M., YOUNG, K., SHOOP, W., KODALI, S., GALGOCI, A., PAINTER, R., PARTHASARATHY, G., TANG, Y.S., CUMMINGS, R., HA, S., DORSO, K., MOTYL, M., JAYASURIYA, H., ONDEIKA, J., HERATH, K., ZHANG, C., HERNANDEZ, L., ALLOCCO, J., BASILIO, A., TORMO, J.R., GENILLOU, O., VICENT, F., PELAEZ, F., COLWELL, L., LEE, S.H., MICHAEL, B., FELCETTO, T., GILL, C., SILVER, L., HERMES, J.D., BARTIZAL, B., SCHMATZ, D., BECKER, J.W., CULLY, D., SINGH, S.B.,. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. **Nature**, 441, 18, 2006..

WILLEY, J.M., WILLINAS, A., KODANI, S., NODWELL, J.R. Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. **Molecular Microbiology**, vol. 59(3), 731-742, 2006.

WILLIAMS, S.T., GOODFELLOW, M., ALDERSON, G., Genus *Streptomyces*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams, S.T., Sharope Holt, J.G., Eds. Baltimore, pp. 241-258., 1989.

WILLIAMS, S.T., GOODFELLOW, M., ALDERSON, G., WELLINGTON, E.M.H., SNEATH, P.H., SACKIN, M. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal Genetic Applied Microbiology**, vol. 129, p. 1743-813, 1983.

XU, L.H., JIANG, Y., LI, W.J., WEN, M.L., LI, M.G., LIN, C. *Streptomyces rosealbus* sp. nov., an actinomycete isolated from soil in yunnan, Chin. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 87, p. 189-194, 2005.

YOO, J.C., KIM, J.H., HA, J.W., PARK, N.S., SOHING, J.K., LEE, J.W., PARK, S.C., KIM, M.S., SEORG, C.N. Production and Biological activity of laidlomycin anti-MRSA /VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. C5684. **The Journal of Microbiology**, vol. 45 (1), p. 6-10, 2007.

YOUNGWANS, S., CHO, K.W., LEE, H.S., YOON, T.M., SHIN, J. New polyene macrolide antibiotic from *Streptomyces* sp. M90025 **Microbiology and Biotechnology**, vol. 10 (2), p. 176-180, 2000.

INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	3
1. Gênero <i>Streptomyces</i> .....	3
2. Identificação .....	6
3. Diferenciação morfológica.....	9
4. Produtos naturais .....	11
4.1 Metabólitos secundários.....	13
4.2 Regulação da produção de metabólitos secundários.....	14
5. Microrganismos de Interesse .....	17
5.1 Microrganismos de interesse clínico .....	17
5.2 Microrganismos Fitopatogênicos.....	23
5.2.1 Fungos Fitopatogênicos.....	24
5.2.2 Bactérias fitopatogênicas .....	25
6. Controle de microrganismo patogêncios .....	27
6.1 Principais Antibióticos .....	27
7. Atividade antimicrobiana de <i>Streptomyces</i> .....	30
ARTIGO 1 .....	34
Preliminary characterization of some <i>Streptomyces</i> species isolated from composting processand their antimicrobial potential.....	35
(Aceito para publicação na revista World Journal of Microbiology and Biotechnology) .....	35
Abstract.....	35
Introduction .....	37
Material and methods.....	39
Isolates.....	39
Characterization of the isolates .....	40
Molecular identification of the isolates.....	40
Restriction digests of amplified products.....	41
Biochemical and physiological characterization of strain 1S .....	41
Genetic characterization of strain 1S .....	42
Antimicrobial activity evaluation .....	43
Submerged cultures .....	44
Antibacterial activity of the filtrate.....	45
Cytotoxic and antiviral activity .....	45
Table 1: Test organisms, used in the antimicrobial assay and percentage of <i>Streptomyces</i> isolates that showed antimicrobial activity, using the double layer method. ....	46
Results .....	48
Table 2: Cultural characteristics of the <i>Streptomyces</i> isolates .....	48
Table 3. <i>Streptomyces</i> isolates that showed a broad spectrum of activity in the antimicrobial assay against 53 test organisms. ....	52
Table 4. Isolates that grew in SC and ISP2 media, in submerge culture condition, and showed inhibitory activity against test bacteria. The inhibition zone was measured and determined by the media of the repetitions. ....	53

Figure 2. Morphological characteristics of <i>Streptomyces</i> 1S under scanning microscope.....	55
Table 5. Physiological characteristics that distinguish strain 1S from the most closely related species. ....	56
Discussion.....	57
References.....	61
<b>ARTIGO 2</b> .....	67
Evaluation of antimicrobial activity of <i>Streptomyces</i> sp. producing antibiotic substances inhibitory to multiresistant <i>Enterococci</i> .....	67
Abstract.....	68
Introduction .....	70
Material and Methods.....	71
Isolates.....	71
Molecular analysis of the isolates.....	71
Antimicrobial susceptibility of test microorganisms .....	72
Antimicrobial activity evaluation .....	73
Primary screening .....	73
Fermentation and extraction.....	74
Antibacterial activity .....	75
Active compound isolation .....	75
Microdilution Method .....	75
Genetic characterization of strain 50.....	76
Biochemical and physiological characterization of <i>Streptomyces</i> strains.....	77
Results and Discussion.....	77
Antimicrobial susceptibility of test microorganisms .....	78
Table 1. Antimicrobial profile of <i>Enterococcus</i> species used as test organisms....	78
Molecular characterization of <i>Streptomyces</i> isolates .....	79
Antimicrobial activity evaluation .....	81
Table 2: <i>Streptomyces</i> isolates that showed antimicrobial activity against <i>Enterococcus</i> strains on solid medium. Preliminary screening.....	82
Table 3. Antimicrobial activity of six highly active <i>Streptomyces</i> isolates against <i>Enterococcus</i> strains using the <i>Streptomyces</i> culture extracts in the agar-well diffusion method . Inhibition zone was measure in millimeters (mm) .....	83
Active compound isolation .....	83
Microdilution Assay .....	84
Genetic characterization of strain 50.....	85
Identification and characterization of strain 50 .....	85
Figure 2. Spore surface ornamentation of isolate <i>Streptomyces</i> sp. 50.....	86
Table 4. Biochemical and morphological characteristics of isolate <i>Streptomyces</i> sp. ....	87
References.....	88
<b>ARTIGO 3</b> .....	93
Estudo de Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana produzidos por <i>Streptomyces</i> sp . 1S.....	93

RESUMO .....	94
Introdução .....	95
Materiais e Métodos .....	97
Perfil de suscetibilidade dos microrganismos.....	97
Avaliação do meio de cultura e da temperatura para produção de moléculas bioativas.....	98
Ensaio de atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em poços.....	99
Efeito da temperatura sobre a atividade antimicrobiana .....	100
Método de Microdiluição .....	101
Tabela 1. Microrganismos teste empregados no ensaio de difusão em poço.....	101
Fungos.....	102
Resultados e Discussão .....	102
Tabela 2. Perfil de suscetibilidade de bactérias teste frente a 12 antimicrobianos .....	103
Tabela 3. Atividade antimicrobiana de <i>Streptomyces</i> sp. 1S crescido em diferentes meios de cultivo, a temperatura de 28 °C durante 48 horas. Média do diâmetro do halo de inibição (halo total em mm) dos microrganismos teste.....	104
Tabela 4. Atividade antimicrobiana de <i>Streptomyces</i> 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 teste empregando o sobrenadante. ....	108
Figura 1. Evolução da biomassa microbiana e do pH durante crescimento de <i>Streptomyces</i> sp 1S em meio ISP2, a temperatura de 28 °C durante 168 horas de crescimento, sob agitação constante. ....	109
Tabela 5. Valor da concentração inibitória mínima, determinada pelo método de microdiluição, da fração aquosa, proveniente do cultivo do isolado <i>Streptomyces</i> sp. 1S em meio ISP2, a temperatura de 28 C durante 96 horas de crescimento.	111
Microrganismo teste .....	111
Referências.....	112
RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL.....	117
REFERÊNCIAS.....	128