

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

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

Themis Collares Antunes¹, Sueli T. Van Der Sand (Or.)¹

Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas na forma de Artigo Científico, a ser submetido ao World Journal Microbiology and Biotechnology.

Porto Alegre, dezembro 2010

¹Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

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

Themis Collares Antunes, Sueli T. Van Der Sand*

T. Collares – S.V. Sand (email)

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Microbiologia
Imunologia e Parasitologia*

ICBS/UFRGS. R. Sarmiento Leite, 500 sala 158

Fone 3308-4505.

- Autor para correspondência- svands@ufrgs.br

Abstract. Os estreptomicetes são bactérias caracterizadas por sua habilidade em formar hifas, amplamente distribuídos no ambiente e conhecidos pela produção de moléculas biologicamente ativas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de seis isolados de *Streptomyces* provenientes de processo de compostagem frente a dezenove cepas de *Enterococcus*. O perfil de susceptibilidade dos *Enterococcus* foi avaliado para onze antibióticos, empregando a técnica de difusão de disco em ágar. A atividade antimicrobiana dos estreptomicetes foi avaliada pela técnica da dupla camada. Os isolados que apresentaram atividade foram cultivados em meio amido caseína à temperatura de 30°C por sete dias, em agitação constante. Após crescimento a cultura foi filtrada para obtenção do extrato bruto. A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada através da técnica de difusão em poço. O isolado que apresentou maior espectro de atividade foi selecionado para crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, medidas de pH e biomassa foram realizadas concomitantemente aos ensaios. Foi aplicada a técnica de cromatografia em camada delgada para separação dos compostos presentes no extrato bruto do isolado selecionado. Todos os isolados de *Streptomyces* foram efetivos contra *Enterococcus* no ensaio de dupla camada. No ensaio de difusão em poço o isolado 8S apresentou maior atividade antibiótica do que os outros isolados de *Streptomyces*. Ao ser crescido em diferentes

fontes de carbono e nitrogênio o extrato produzido por este isolado teve melhor ação antibiótica em amido e nitrato potássio. Não foi notada influência do crescimento ou da medida de pH para produção de moléculas antibióticas.

Keywords: *Streptomyces*, *metabólitos*, *resistência a antimicrobianos*, *cocos Gram positivas*.

Introdução

Os actinomicetos correspondem a um grupo de bactérias Gram-positivas que apresentam um crescimento de micélio aéreo e sobre o substrato extensivamente ramificado. O gênero *Streptomyces* é representado na natureza por uma grande variedade e número de espécies produtoras da maioria dos antibióticos conhecidos na família Actinomycetaceae (Thakur et al. 2009). Membros do gênero *Streptomyces* são conhecidos por serem uma fonte de antibióticos, pela sua diversidade de metabólitos secundários, incluindo agentes antifúngicos (Thakur et al., 2007), agentes antitumorais (Konishi, M. et al, 1991), agentes anti-helmínticos (Sanglier, J.J et al, 1993) e herbicidas (Lee, H.B et al, 2003). A habilidade das culturas de *Streptomyces* para a produção de antibióticos não é uma propriedade fixa, mas pode ser aumentada ou completamente perdida sobre diferentes condições de nutrição e cultivo (Waksman SA 1961). Portanto, a constituição do meio de cultura juntamente com a capacidade metabólica do organismo produtor afeta a biossíntese do antibiótico (Hassan, et al. 2001). Fontes nutricionais como carbono, nitrogênio e minerais e fatores ambientais como tempo, temperatura e pH tem uma profunda influência na produção de antibióticos pelos actinomicetos (Narayana, and Vijavalakshmi, 2008).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de fontes nutricionais na capacidade de produção de substâncias bioativas produzidas por seis isolados de *Streptomyces* contra isolados de *Enterococcus* de origem clínica e ambiental.

Material e Métodos

Isolados de actinomicetos

Os seis isolados de *Streptomyces* sp. utilizados neste estudo pertencem a bacterioteca do laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS. Os microorganismos foram isolados e identificados através de provas morfológicas, bioquímicas e moleculares por Oliveira (2002).

Perfil de susceptibilidade das amostras de *Enterococcus* sp.

Os dezenove isolados de *Enterococcus* sp. utilizados no estudo pertencem a bacterioteca do laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS. Os isolados são oriundos de amostras clínicas e ambientais isolados e cedidos pela Dr. Ana Paula Guedes Frazzon.

O perfil de susceptibilidade das amostras de *Enterococcus* foi determinado através da técnica de difusão de disco em ágar conforme as recomendações da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2007. Os antibióticos empregados no antibiograma foram: ampicilina (AMP), cefoxitina (CFO), ciprofloxacino (CIP), cloranfenicol (CLO),

eritromicina (ERI), imipenem (IMP), nitrofurantóina (NIT), norfloxacina (NOR), penicilina (PEN), tetraciclina (TET) e vancomicina (VAN).

Tabela 1. Origem de *Streptomyces* e *Enterococcus* aplicados no estudo.

	Isolados	Origem
<i>Streptomyces</i>	2S, 3S, 8S	Central de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos de Sapiranga
	48, 50, AP	Composteira experimental da Faculdade de Agronomia – UFRGS.
<i>Enterococcus</i>	3.2, 3.8, 3.19, 3.20, 4.16, 5.4, 5.6, 5.13, 5.16 (ambientais)	Arroio Dilúvio
	155 (clínico)	Desconhecida
	488, 570, 581, 603, 617, 619, 1247, 1300 (clínicos) 555 (clínico)	Urina Cateter

Atividade antimicrobiana dos isolados de *Streptomyces*.

Técnica da dupla camada

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

Produção de extrato bruto

Para a produção do extrato de interesse, os isolados foram crescidos em frascos de 250 mL contendo 50 mL caldo amido caseína (AC: amido, 10 g; caseína, 0,12g; NaCl, 2,0 g; KNO₃, 2,0g; K₂HPO₄, 2,0g; MgSO₄, 0,05g; FeSO₄, 0,01g, CaCO₃ 0,02 g) sob agitação por 7 dias a 30°C. O pré-inóculo para cada isolado de *Streptomyces* sp. foi preparado em meio AC cultivado por 48h a 30°C sob agitação de 100 r.p.m. Após esse período, 5 mL do cultivo com crescimento celular foi transferido para um novo frasco contendo o mesmo meio de cultura e permaneceu em crescimento por 7 dias sob as mesmas condições de temperatura e agitação descritas acima. As amostras coletadas no final do período foram submetidas ao processo filtração utilizando-se membrana filtrante (0,22 µm) para a obtenção do extrato bruto livres de células.

Técnica de difusão em poço

O ensaio de difusão em poço consistiu na semeadura utilizando um swab impregnado de uma cultura *Enterococcus* sp. na concentração de 10⁸ células/mL (0,5 da escala de MacFarland) sobre uma placa contendo agar Muller Hinton. Após a semeadura foram realizados poços utilizando cilindros de aproximadamente 9 mm, distribuídos equidistantes na placa. Em cada poço, foram aplicados 100 µl do extrato bruto de cada isolado. A placa permaneceu primeiramente a 4°C por 16 horas para a difusão do extrato no meio de cultura e posteriormente foi incubado a 37°C por 48h. A partir desta técnica foi determinada a atividade quantitativa dos extratos através da medição dos halos de inibição, formados pelos extratos produzidos pelos isolados, perante o microorganismo de interesse.

Baseado nos resultados obtidos no ensaio de sobrecamada e no ensaio de poço escolheu-se o isolado de *Streptomyces* que apresentou maior espectro de atividade em ambas as análises.

Crescimento e produção de metabólitos sob diferentes fontes de carbono

O ensaio da produção de metabólitos do isolado de interesse sob diferentes fontes de carbono foi realizado contra os *Enterococcus* sp. que apresentam maior perfil de resistência no antibiograma. Para avaliar o efeito da fonte de carbono na produção de antibiótico e na biomassa, diferentes fontes de carbono - amido, sacarose, glicerol e glicose - foram adicionados individualmente ao meio basal contendo caseína, 0,3g; NaCl, 2,0 g; K₂HPO₄, 2,0g; MgSO₄, 0,05g; FeSO₄, 0,01g, CaCO₃ 0,02 g. As fontes de carbono foram adicionadas na concentração de 1% no meio basal suplementado com KNO₃, 2,0g; como fonte de nitrogênio. O isolado 8S foi inoculado em frascos de 250 mL contendo 50 mL dos meios com diferentes fontes de carbono para a produção do pré-inóculo e após o período de 48h de crescimento 5 mL de cada pré-inóculo foram transferidos para novos meios líquidos de cultura de acordo com a fonte de carbono. Para os ensaios com cada fonte de carbono cinco frascos foram inoculados com o isolado de actinomiceto. As análises de produção de antimicrobiano foram realizadas a cada 24h por 5 dias. As amostras foram filtradas através do uso de membrana filtrante (0,22µm) para obtenção do extrato-teste. Após a filtração a membrana de cada amostra foi acondicionada em estufa de 37°C para pesagem e posterior determinação do peso seco. Também foi determinada o pH de cada amostra por tempo de crescimento. Para determinar a atividade

antimicrobiana alíquotas foram retiradas no tempo zero (inoculação), intervalos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. A atividade dos extratos com relação ao tempo de crescimento microbianos foi realizada utilizando a técnica de difusão em poço. A fonte de carbono que apresentou maior efeito positivo em menor tempo contra os *Enterococcus* sp. foi submetida ao crescimento em diferentes fontes de nitrogênio.

Crescimento e produção de metabólitos sob diferentes fontes de nitrogênio

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

Concentração mínima inibitória (MIC)

Para determinação da concentração mínima inibitória do extrato bruto de 72 horas produzido pelo isolado escolhido foram realizadas diluições do mesmo em meio tripticaseína de soja (*TSB*) nas proporções de 1 até 1/64. O ensaio foi realizado em microplacas de polipropileno com 96 poços e cada poço foi preenchido com 90 μ l do extrato do isolado e suas respectivas diluições acrescidas de 10 μ l de amostras dos *Enterococcus* na concentração final de 10^5 CFU/mL. As placas foram incubadas a 37°C

por 24 horas. A viabilidade das diluições foi determinada através da semeadura de 20 ul de cada poço em meio tripticaseína de soja (TSA).

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia foi realizada com o uso de tiras de papel de sílica (fase estacionária) e os seguintes solventes (fase móvel): água destilada, clorofórmio e diclorometano, colocados separadamente em recipientes de vidro no volume de 20 mL cada. Foram colocados 10µL do extrato bruto produzido pelo isolado 8S sob as melhores condições nutricionais de carbono e nitrogênio sobre a fase estacionária e os solventes subiram por capilaridade por aproximadamente 3 horas. As manchas foram reveladas por meio de lâmpada ultravioleta (Handheld UV Lamp Model 9403F) nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm.

Resultados e Discussão

O perfil de susceptibilidade, determinado através da técnica de difusão de disco em ágar, das amostras ambientais e clínicas de *Enterococcus* sp. mostrou que estas são resistentes a pelo menos dois antibióticos (Tabela 2 e 3). Nas amostras clínicas prevaleceu a resistência a pelo menos três antibióticos. A maioria das amostras clínicas apresentou resistência a tetraciclina (60%), eritromicina (90%) e cefoxitina (80%), as amostras ambientais em sua grande parte tiveram resistência notável a eritromicina (55,56%) e cefoxitina (88,89%). A habilidade deste grupo em adquirir novos genes de resistência importados em plasmídeos, transposons e transposons conjugativos é perturbadora, especialmente se essas

resistências estão associadas com o aumento de sua patogenicidade (Amyes 2007).

Tabela 2 Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados ambientais de *Enterococcus* sp

<i>Enterococcus</i>	CFO ^a	TET ^b	VAN ^c	AMP ^d	IMP ^e	PEN ^f	CLO ^g	CIP ^h	ERI ⁱ	NOR ^j	NIT ^k
3.2	R	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S
3.8	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
3.19	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
3.20	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
4.16	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S
5.4	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
5.6	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R
5.13	R	S	S	S	S	S	S	S	I	I	R
5.16	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R

^aCefoxitina; ^bTetraciclina; ^cVancomicina; ^dAmpicilina; ^eImipenem; ^fPenicilina; ^gCloranfenicol; ^hCiproxacina; ⁱEritromicina; ^jNorfloxacina; ^kNitrofurantoína. R= resistente; I= intermediário; S= sensível.

Tabela 3 Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados clínicos de *Enterococcus* sp

<i>Enterococcus</i>	CFO ^a	TET ^b	VAN ^c	AMP ^d	IMP ^e	PEN ^f	CLO ^g	CIP ^h	ERI ⁱ	NOR ^j	NIT ^k
155	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R
488	R	I	S	S	R	R	S	R	S	S	S
555	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S
570	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S
581	R	R	S	S	S	S	R	I	R	I	S
603	I	R	S	S	S	S	R	I	R	S	S
617	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S
619	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	S
1247	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S
1300	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S

^aCefoxitina; ^bTetraciclina; ^cVancomicina; ^dAmpicilina; ^eImipenem; ^fPenicilina; ^gCloranfenicol; ^hCiproxacina; ⁱEritromicina; ^jNorfloxacina; ^kNitrofurantoína. R= resistente; I= intermediário; S= sensível.

O gênero *Enterococcus* tem surgido como um dos mais importantes patógenos hospitalares no mundo inteiro. A frequência de seu isolamento vem aumentando desde a última década e, paralelamente ao aumento da incidência, tem-se observado rápida elevação na frequência de cepas resistentes aos antimicrobianos de uso corrente (Höner et al 2005). De acordo com as pesquisas recentes da National Nosocomial Infections Surveillance os *Enterococcus* permanecem na terceira posição como o patógeno mais comum causador de infecções nosocomiais (Fraser et al, 2010).

Além da resistência aos beta-lactâmicos e aos glicopeptídeos, os *Enterococos* adquiriram resistência elevada a outros antimicrobianos, por mutação ou transferência de plasmídios. Estes enterococos multirresistentes são também resistentes ao cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina e rifampicina variando seu isolamento com características locais (Tavares 2000).

No ensaio de dupla camada os seis isolados de *Streptomyces* utilizados foram efetivos contra os *Enterococcus* sp. de origem ambiental (Tabela 4). Das amostras clínicas o isolado 155 de *Enterococcus* sp. não sofreu inibição por nenhum isolado de *Streptomyces* (Tabela 5). No ensaio de difusão em poço o extrato produzido pelo isolado *Streptomyces* AP apresentou atividade inibitória contra 22,22% das amostras ambientais e 50% das amostras clínicas (Tabela 6 e 7). O extrato bruto produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S mostrou maior atividade antimicrobiana contra os isolados de *Enterococcus* sp., no entanto, este resultado não foi efetivo para a amostra 155 (Fig. 1).

No ensaio sob diferentes fontes de carbono, a melhor atividade antimicrobiana em menor tempo ocorreu na presença do amido como fonte de carbono, com formação de halos com diâmetros que variaram de 20-25 cm em 72 horas de crescimento do isolado 8S (Tabela 8). A produção de metabólitos com atividade antimicrobiana foi notada a partir do P.I. para sacarose e amido. O uso de sacarose apresentou dois picos máximos de atividade, 96 horas e 120 horas, sendo a atividade antimicrobiana maior no último pico. Os picos de atividade máxima antimicrobiana, observados no uso de sacarose como fonte de carbono podem indicar que o isolado ao degradar o dissacarídeo em glicose e

frutose pode utilizar os monossacarídeos para produção de compostos secundários com propriedades antimicrobianas. A produção de metabólitos com ação antimicrobiana no meio contendo glicerol foi observada após 48 horas, tendo atividade máxima em 72 horas.

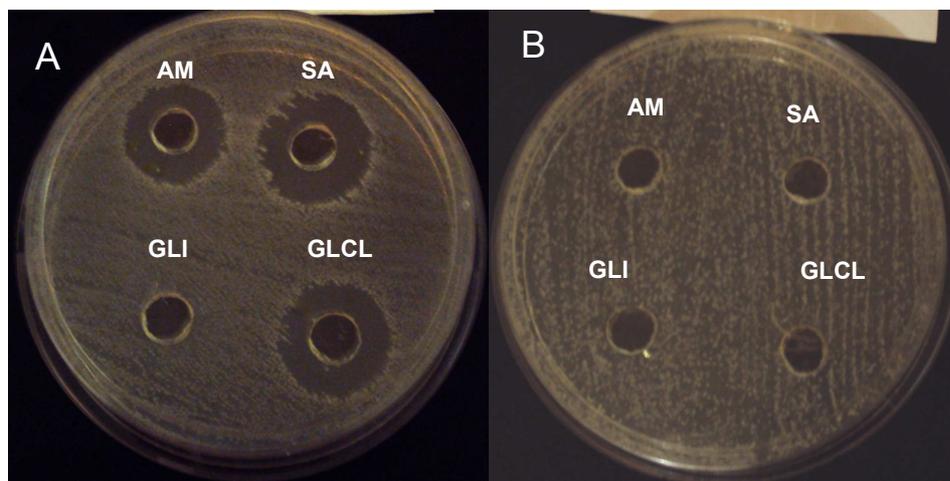


Fig. 1 Ensaio de difusão em poço. Atividade antibiótica do extrato bruto produzido pelo isolado 8S sob diferentes fontes de carbono (AM: amido; SA: sacarose; GLI: glicose; GLCL: glicerol).

A – *Enterococcus* ambiental 5.4. Halos presentes em AM, AS e GLCL B – *Enterococcus* clínico 155. Ausência de halos de inibição.

Tabela 4 Perfil da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* sp. contra *Enterococcus* sp. de origem ambiental pela técnica de dupla camada

<i>Streptomyces</i>	2S	3S	8S	48	50	AP
<i>Enterococcus</i>						
3.2	+	+	+	+	+	+
3.8	+	+	+	+	+	+
3.19	+	+	+	+	+	+
3.20	+	+	+	+	+	+
4.16	+	+	+	+	+	+
5.4	+	+	+	+	+	+
5.6	+	+	+	+	+	+
5.13	+	+	+	+	+	+
5.16	+	+	+	+	+	-

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

Tabela 5 Perfil da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* sp. contra *Enterococcus* sp. de origem clínica pela técnica de dupla camada

<i>Streptomyces</i> \ <i>Enterococcus</i>	<i>Streptomyces</i>					
	2S	3S	8S	48	50	AP
155	-	-	-	-	-	-
488	+	+	+	+	+	+
555	+	+	+	+	+	+
570	+	+	+	+	+	+
581	+	+	+	+	+	+
603	+	+	+	+	+	+
617	+	+	+	+	+	+
619	+	+	+	+	+	-
1247	+	+	+	+	+	+
1300	+	+	+	+	+	+

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

Tabela 6 Perfil da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* sp. contra *Enterococcus* sp. de origem ambiental. Técnica de difusão em poço

<i>Streptomyces</i> \ <i>Enterococcus</i>	<i>Streptomyces</i>					
	2S	3S	8S	48	50	AP
3.2	17	23	25	21	21	-
3.8	19	23	25	23	25	-
3.19	17	22	26	22	25	-
3.20	17	22	27	21	25	-
4.16	25	23	23	21	17	-
5.4	21	25	29	25	25	-
5.6	17	21	25	19	21	18
5.13	19	23	19	21	24	19
5.16	21	21	27	23	25	-

Diâmetro da zona de inibição (mm).

Tabela 7 Perfil da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* sp. contra *Enterococcus* sp. de origem clínica. Técnica de difusão em poço

<i>Streptomyces</i> \ <i>Enterococcus</i>	<i>Streptomyces</i>					
	2S	3S	8S	48	50	AP
155	-	-	-	-	-	-
488	18	25	29	28	27	-
555	21	25	37	25	37	25
570	13	25	29	29	23	-
581	21	21	29	29	37	-
603	25	25	37	29	14	21
617	25	25	37	29	33	33
619	25	25	37	29	41	17
1247	-	24	37	26	33	21
1300	-	-	29	25	33	-

Diâmetro da zona de inibição (mm).

No presente estudo, o isolado 8S produziu metabólitos secundários bioativos na presença de amido, sacarose e glicerol como fontes de carbono. O uso de glicose como fonte de carbono foi observado crescimento celular, porém a produção de metabólitos bioativos não foi detectável ou encontrava-se em baixa concentração. A glicose é uma molécula mais simples que as demais fontes de carbono e pode estar sendo metabolizada mais rapidamente e contribuindo apenas para síntese de material celular. Dessa forma, uma pequena quantidade de carbono e energia fica disponível para a produção de antibióticos.

A glicose tem sido usada extensivamente como substrato para crescimento e produção por fermentação de um grande número de antibióticos e metabólitos secundários. Entretanto, a produção desses compostos pode ser negativamente afetada pela concentração deste carboidrato assim como a absorção de outras fontes de carbono rapidamente assimiláveis. A influência negativa da D-glicose vem sendo bem documentada em diversos antibióticos. Contudo, exceto para alguns exemplos como a biossíntese de eritromicina por *Sacharopolyspora erythrae* ou formação de actinomicina D em *Streptomyces antibioticus*, a base bioquímica e molecular dessa repressão não foi claramente estabelecida e o processo regulador envolvido permanece sem elucidação (Escalante et al. 1999).

Relacionando o uso da sacarose e da glicose como fontes de carbono podemos inferir que a hidrólise da molécula de sacarose em duas fontes de açúcar permite que o organismo tenha um saldo energético para a produção de metabólitos secundários, utilizando os compostos tanto para síntese de material celular quanto para a produção de compostos

bioativos. Além disso, o crescimento do microrganismo não está diretamente relacionado com a produção de extratos antimicrobianos, um organismo pode crescer sem produzir metabólitos com esta função, ou seja, mesmo que o meio promova o crescimento do isolado a produção de moléculas bioativas pode ser baixa. Thakur et al (2009) ao testar a influência da nutrição na produção de metabólitos antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* sp. 201 verificaram que a capacidade de formação de zonas de inibição não estava correlacionada com o peso seco do micélio.

Em relação à biomassa, o crescimento de 8S foi constante durante os cinco dias na presença de amido (Fig. 2). Para sacarose o crescimento apresentou um decréscimo após 72 horas e um novo pico após 96 horas. Através desses resultados pode-se inferir que, para tais condições, a biomassa não apresenta relação direta com a produção de metabólitos com ação antimicrobiana para as fontes de carbono analisadas separadamente. Quando comparados amido e sacarose, observa-se que a sacarose apresenta maior atividade que o amido com menor crescimento celular para os períodos de 24 horas e 120 horas. Diferente dos resultados encontrados neste experimento, Sarra et al (1993) obtiveram maior peso seco e maior atividade antimicrobiana de *Streptomyces lividans* TK21 quando crescido em amido comparado a sacarose. O mesmo fato ocorreu quando Zahrani (2007) estudou o efeito de diferentes fontes de carbono sob *Streptomyces* isolado J12. Já Os experimentos relatados por Sathi et al (2001) apontam a sacarose como melhor fonte de carbono para atividade antimicrobiana.

O pH da cultura manteve-se constante quando as fontes de carbono foram sacarose e glicerol (pH 8,0). O isolado crescido tendo amido como fonte de carbono, manteve-se com pH 6,0 a partir de 48 horas, e no meio com glicose o pH 7,0 apresentando decaimento em 24 e 120 horas (Fig. 3).

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

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

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

Diâmetro de zona de inibição (mm).

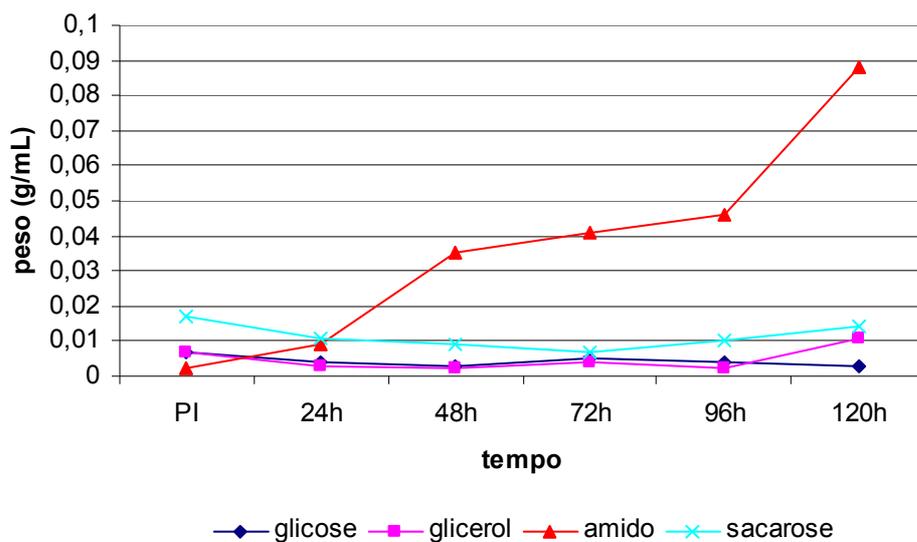


Fig. 2 Curva de crescimento do isolado *Streptomyces* 8S em diferentes fontes de carbono. Agitação de 100 r.p.m, 30°C durante 120 horas de crescimento

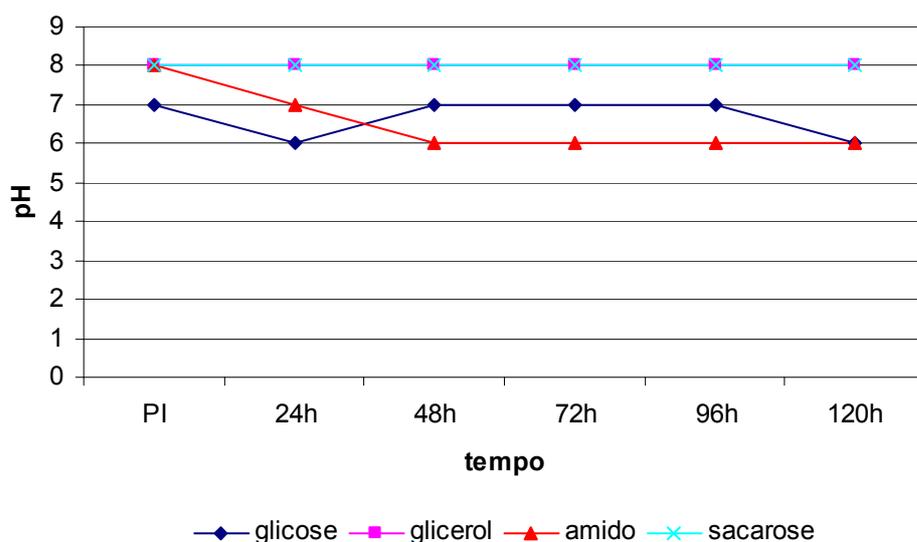


Fig. 3 Determinação do pH da cultura do isolado *Streptomyces* 8S quando crescido em diferentes fontes de carbono

No ensaio utilizando-se diferentes fontes de nitrogênio, nitrato de potássio mostrou melhor ação antimicrobiana do que as demais fontes de nitrogênio utilizadas. Thakur et al (2009) ao testar a influência da suplementação de nitrogênio na produção de metabólitos antimicrobianos por *Streptomyces* sp. 201 detectaram maior formação de zona de inibição com o uso de nitrato de potássio e asparagina. O ensaio antimicrobiano

realizado com o pré-inóculo não mostrou atividade antimicrobiana quando o nitrogênio era oriundo de extrato de levedura. Os extratos compostos por sulfato de amônia, extrato de levedura e peptona apresentaram atividade apenas depois de 72 horas de crescimento. Tanto o extrato produzido com o uso de peptona quanto o produzido com extrato de levedura apresentaram atividade máxima após 120 horas (Tabela 9). Ao testar a influência de fontes de nitrogênio Al-Zahrani (2007) obteve as maiores atividades antimicrobianas nos meios de culturas contendo nitrato de potássio, extrato de levedura e peptona, respectivamente, e sulfato de amônia apresentou a menor formação de zona de inibição.

Tabela 9 Perfil de atividade antimicrobiana do isolado 8S contra *Enterococcus* sp. clínicos, ambientais e *E.faecium* ATCC crescido nas fontes de nitrogênio: sulfato de amônia (AS), peptona (PEP), extrato de levedura (EL) e nitrato de potássio (KNO₃).

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

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

Diâmetro de zona de inibição (mm).

O isolado 8S apresentou maior biomassa nos meios contendo fontes orgânicas de nitrogênio (peptona e extrato de levedura) onde também foi possível observar a produção de um pigmento na cor marrom. Himabindu & Jetty (2006) demonstraram em estudos com *Micromonospora echinospora* que o meio suplementado com extrato de levedura é favorável ao crescimento físico do microrganismo, mas não é favorável para a produção de antibióticos. O crescimento do isolado foi constante até as primeiras 96 horas com suprimento de nitrato de potássio e sulfato de amônia, após esse período observou-se uma declínio na produção de biomassa (Fig. 4). O crescimento do isolado 8S no meio de cultura nitrato de potássio como fonte de nitrogênio manteve o pH estável em 7,0 até as 96h de crescimento apresentando um declínio para pH5,0 após este período. No meio contendo peptona e também extrato de levedura o pH dos cultivos permaneceram em torno de 6,0. Em sulfato de amônia o pH inicial foi 6,0 subindo para pH 7,0 após 24 h e decaindo para pH 5,0 após 72 horas (Fig. 5).

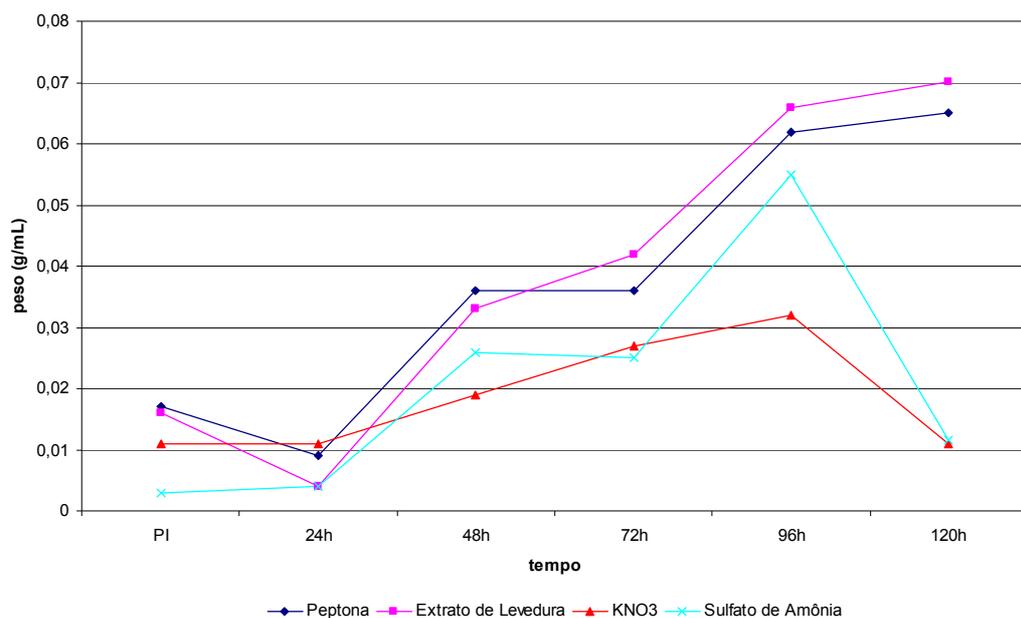


Fig. 4 Curva de crescimento do *Streptomyces* 8S utilizando-se diferentes fontes de nitrogênio. Em agitação de 100 r.p.m a 30°C durante 120 horas de crescimento

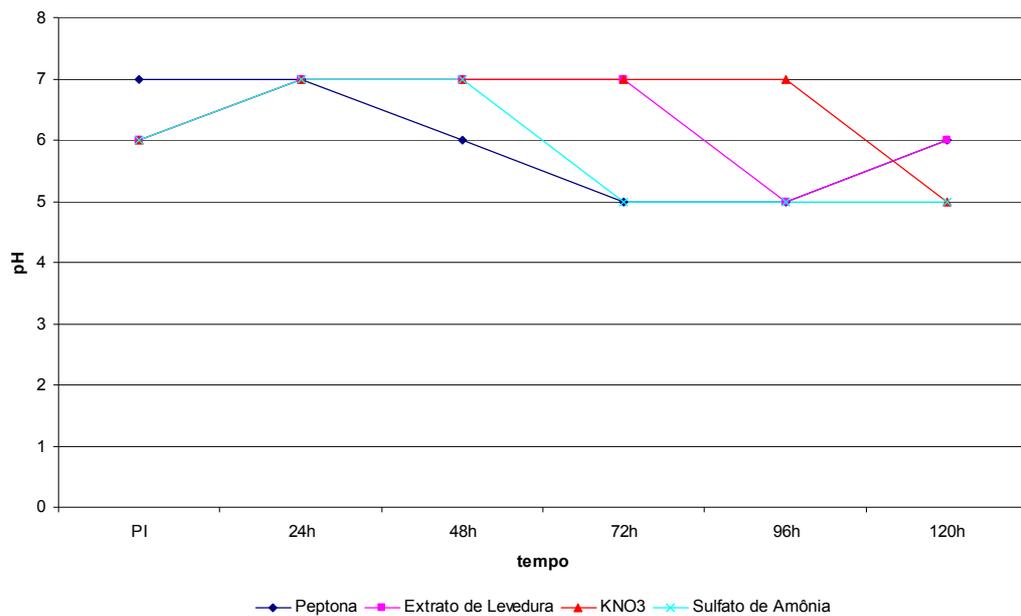


Fig. 5 Medidas de pH do *Streptomyces* 8S em diferentes fontes de nitrogênio. Em agitação de 100 r.p.m, 30°C durante 120 horas de crescimento

O decréscimo de pH observado para glicose como fonte de carbono e para sulfato de amônia como fonte de nitrogênio, pode influenciar na produção de antibióticos assim como o crescimento das culturas. Vasavada et al (2006) reportaram a influência do pH na produção e no crescimento de *Streptomyces sannanensis* e observaram que essa espécie, assim como outras pertencentes ao gênero, secretam metabólitos antimicrobianos em condições alcalinas e que o crescimento também é influenciado pela taxa de pH. O mesmo efeito foi observado por Sultan et al (2002) ao obter melhores condições de produção in vitro de metabólitos ativos de *Streptomyces* em pH 8 e diminuição de produção com a acidificação do pH. Neste presente estudo, a melhor atividade obtida foi em pH 6 perante a suplementação de amido e nitrato potássio.

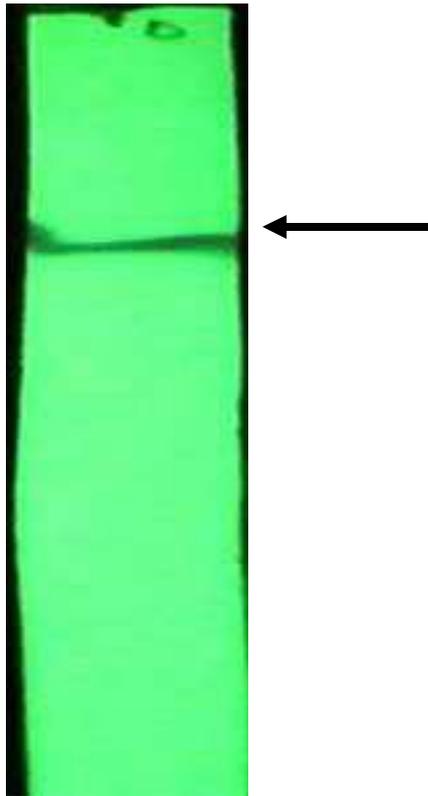
A concentração mínima inibitória (MIC) do composto produzido pelo isolado 8S contra as amostras de *Enterococcus* 155, 5.16, 5.4, 581, 5.6, 4.16, 619, 1300 e *E. faecium* foram 0 (ausente), 1:32, 1:32, 1, 1:32, 1, 1:64, 1:8 e 1 respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 Concentração mínima inibitória do extrato de 72 horas produzido pelo isolado 8S

<i>Enterococcus</i>	Diluição mínima inibitória
155	-
5.16	1:32
5.4	1:32
581	1
5.6	1:32
4.16	1
619	1:64
1300	1:8
<i>E. faecium</i>	1

A cromatografia em camada delgada realizada com o solvente diclorometano mostrou a presença de uma banda visualizada com luz UV no comprimento 254 nm. (Fig. 8).

A ausência de outras bandas pode estar relacionada ao fato destas não serem visíveis nos comprimentos de onda utilizados.



Diclorometano (Fase móvel 100% diclorometano).

Fig. 8 Identificação de compostos bioativos do isolado de *Streptomyces* 8S usando a técnica de cromatografia em camada delgada

Conclusões

- Todos os isolados de *Streptomyces* apresentaram atividade contra *Enterococcus* sp.
- O isolado 8S mostrou um maior espectro de atividade antimicrobiana.
- A fonte de carbono e nitrogênio pode influenciar na capacidade de produção de metabólitos secundários.
- A atividade antimicrobiana do isolado 8S foi melhor utilizando-se amido e nitrato de potássio como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente.
- O pH não apresentou grandes variações frente as diferentes fontes nutricionais de carbono e nitrogênio.

- A produção de antibióticos é influenciada pelo tipo e qualidade dos elementos nutricionais e fatores ambientais.

Agradecimentos. Aos meus amores: pais, irmã e a vó Noemia. A Professora Sueli pelo apoio, paciência e carinho. As meninas do laboratório 164, especialmente a Sabrina.

Referências

AL-ZAHRANI, S.H.M (2007) Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from Jazan. JKAU. 19:127-138.

AMYES, G.B. (2007) Enterococci and streptococci. International Journal of Antimicrobial Agents. 29:S43-S52.

COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE CLSI. (2003). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Nona Edição. Documento M2-A9 Vol.26.

ESCALANTE et al (1999) Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius* Appl Microbiol Biotechnol 52:572-578.

FRASER, L. et al (2010). Enterococcal Infections (Infectious disease). eMedicine Clinical Reference.

HASSAN, MA., EI-NAGGAR, MY. and SAID, WY. (2001). Physiological factor affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. *Egyptian Journal of Biology*.3:1-10.

HIMABINDU, M and A. JETTY (2006). Optimization of nutritional requirements for gentamicin production by *Microsmonospora echinospora*. *Indias J. Exp. Biol.* 44:842-848.

HÖRNER et al (2005). Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *J Bra Patologia Medicina Lab.* 41:391-395.

KONISHI, M et al (1991) Dynamics new antibiotics with the 1,5 diyn-3-ene and anthraquinone subunit. Production, isolation and physico-chemical properties, *J Antibiotics* 44:1300–1305

LEE, HB; et al (2003) A bleaching herbicidal activity of methoxyhygromycin (MHM) produced by an actinomycete strain *Streptomyces* sp, 8E-12, *Lett Appl Microbiol* 36: 387–391.

NARAYANA, K.J.P and M. VIJAYALAKSHMI.(2008). Optimization of antimicrobial metabolites production by *Streptomyces albidoflavus*. *Res. J. Pharmacol.* 2:4-7.

OLIVEIRA, M.F. (2002). Identificação de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

SANGLIER J.J, et al (1993) Novel bioactive compounds from actinomycetes Res. Microbiol 144: 633–642.

SARRA et al (1993) Application of factorial design to the optimization of medium composition in batch cultures of *Streptomyces kyida* TK21 producing a hybrid antibiotic. Biotechnology letters 15(6):559-564.

SATHI et al (2001). Identification and in vitro antimicrobial activity of a compound isolated from *Streptomyces* species. Pakistan Journal of Biological Sciences 4(12):1523-1525.

SULTAN et al (2002) In vitro antibacterial activity of a active metabolite isolated from *Streptomyces* Species. Biotechnology, Asian Network for Scientific Information 1(2-4):100-106.

TAVARES, W. (2000). Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 33(3):281-301.

THAKUR,D. et al (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 Med 17 : 242–249

THAKUR D, et al. (2009). Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *Journal De Mycologie Médicale*. 19:161-167.

WAKSMAN S.A. (1961). The actinomycetes. Classification, identification and description of genera and species. Baltimore: The Williams and Wilkins Co. 2:61-292.

VASAVADA et al (2006) Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Current Science* 91:1393-1397.