

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Luciana Pasqualini Milagre

**Avaliação da atividade antifúngica de metabólitos produzidos por actinomicetos no controle do crescimento de leveduras de ambiente aquático**

Porto Alegre  
05/2014

Luciana Pasqualini Milagre

**Avaliação da atividade antifúngica de metabólitos produzidos por actinomicetos no controle do crescimento de leveduras de ambiente aquático**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Van der Sand

Porto Alegre  
05/2014

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de alguma maneira fizeram parte da confecção deste trabalho, seja ajudando na bancada do laboratório, esclarecendo dúvidas, auxiliando na hora da escrita ou também nos momentos de descontração.

Agradeço à minha orientadora Dra Sueli Van der Sand pela oportunidade de realizar meu trabalho de conclusão e por toda ajuda durante sua realização.

Às colegas do 209 por fazerem os dias no laboratório mais animados.

À Elisandra Minotto e Thaisa Feltrin pelas milhares de dúvidas tiradas ao longo, não só deste trabalho, mas de todos os anos de laboratório juntas, aprendi muito com vocês.

À Ana Ballarini por toda a ajuda e disponibilidade mesmo com os horários superlotados e corridos, fez muita diferença pra mim.

À minha família, Antônio, Marta e Rodrigo, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	<b>5</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>6</b>
1.1 LEVEDURAS AQUÁTICAS .....	7
1.2 GÊNERO <i>CANDIDA</i> .....	8
1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	10
1.4 ACTINOMICETOS.....	12
1.5 GÊNERO <i>STREPTOMYCES</i> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>16</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>17</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
<b>2 MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>21</b>
2.1 STRAINS SELECTED .....	21
2.2 EXTRACTION OF METABOLITES FROM ACTINOMYCETES.....	21
2.3 CONCENTRATION OF THE CRUDE EXTRACT .....	22
2.4 EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY .....	22
2.5 MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) .....	22
<b>3 RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	<b>23</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>33</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>5 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS ADICIONAIS</b> .....	<b>40</b>

## RESUMO

Em ambientes aquáticos encontram-se diferentes populações de leveduras que constituem uma comunidade altamente diversa. Nesta comunidade, entre as espécies encontradas, há patógenos oportunistas associados a doenças humanas. Muitas das espécies causam infecções invasivas podendo apresentar risco de morte. Além disso, tem sido relatado um número cada vez maior de microorganismos resistentes aos antifúngicos mais utilizados na clínica. As actinobactérias são conhecidas pela expressiva produção de metabólitos secundários, podendo ser uma fonte de novos antifúngicos com atividade contra leveduras patogênicas e resistentes. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação antifúngica de extratos produzidos pelos isolados de actinomicetos R18(6), 6(2) e 6(4), no controle do crescimento de nove isolados de leveduras de ambiente aquático. Realizou-se o teste de difusão dos metabólitos de actinomicetos adicionando-se 100 µL em poços de 9 mm em placas de cultivo, e foi avaliada a formação de halos de inibição de crescimento das leveduras. Após foi realizado o teste da concentração inibitória mínima (CIM) com os extratos centrifugados e extratos brutos, assim chamados após ter sido feita uma extração com acetato de etila. Compostos resultantes do metabolismo do isolado R18(6) inibiram 73% do total de leveduras no teste de difusão em ágar e duas delas (18%) foram inibidas pelos compostos presentes nos extratos obtidos dos três isolados de actinomicetos. Todas as leveduras testadas apresentaram halos de inibição para pelo menos um dos extratos utilizados. O isolado R18(6) apresentou melhor inibição no CIM com o extrato centrifugado, enquanto os isolados 6(4) e 6(2) foram mais efetivos com os extratos brutos, inibindo todas as leveduras testadas em pelo menos uma das concentrações do CIM. Foi observado que os extratos de actinomicetos possuem compostos com atividade antimicrobiana às leveduras de ambiente aquático testadas neste estudo.

**Palavras-chave:** actinomicetos, CIM, extratos, leveduras de ambiente aquático.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A qualidade de vida do ser humano está diretamente relacionada com a disponibilidade e a qualidade da água. Nas últimas décadas, o grande crescimento populacional e o conseqüente aumento das atividades industriais contribuíram para problemas ambientais, principalmente em relação à contaminação da água. A poluição dos mananciais de água é consequência direta da ação humana, sendo mais relevante em áreas altamente urbanizadas. Resíduos liberados nos ambientes aquáticos podem causar mudanças na composição das comunidades que os habitam, prejudicando organismos presentes, bem como causando danos para os humanos (Blume et al., 2010).

Apesar de microscópicos, microrganismos são responsáveis pelas condições ambientais que permitem a nossa sobrevivência, podendo também serem utilizados como organismos indicadores da qualidade do ambiente (Hagler, 2006). É importante que os locais responsáveis pela captação, armazenamento e distribuição de água certifiquem-se de que ela não apresenta organismos patogênicos, assim protegendo os consumidores do risco de contrair doenças. No entanto, em muitos desses locais as análises se baseiam apenas em testes que monitoram a presença de bactérias, como o teste de coliformes totais e presença de *Escherichia coli*, não levando em consideração a presença de, por exemplo, leveduras com potencial patogênico (Pereira et al., 2009).

Bactérias são o grupo de microrganismos mais estudados com relação a qualidade de água potável. No passado, os fungos não eram considerados de importância quando microrganismos patogênicos em ambientes aquáticos eram discutidos. No entanto, nas últimas décadas o foco nos fungos, principalmente os patogênicos, tem aumentado e sua presença passou a ser considerado um problema crônico em sistemas de distribuição de água (Hageskal et al., 2009).

Há cada vez mais estudos sobre o potencial de degradação de substâncias naturais e antropogênicas complexas que fungos possuem devido a sua vasta capacidade enzimática, bem como relatos da sua possível patogenicidade a humanos, animais e plantas (Pereira et al., 2009).

## 1.1 Leveduras de ambiente aquático

A água potável dos sistemas de distribuição é colonizada por microrganismos heterótrofos saprófitos (como bactérias, fungos filamentosos e leveduras), ou seja, que crescem em matéria orgânica biodegradável (Yamaguchi et al., 2007). Um número elevado de espécies de leveduras pertencentes a diferentes gêneros tem sido isoladas de ambientes de água doce, sendo a maioria delas originadas, provavelmente, de ambientes terrestres, que chegam aos corpos d'água através de esgotos e chuva. Ambientes aquáticos considerados limpos apresentam menor quantidade de leveduras e são frequentemente populações de espécies não-fermentativas. Por outro lado, águas poluídas são dominadas por densas populações de leveduras, sendo em sua maioria espécies fermentativas, incluindo espécies oportunistas como *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. (Medeiros et al., 2008).

Comunidades de leveduras em ambientes aquáticos são altamente diversas e muitas das espécies encontradas são patógenos oportunistas. As leveduras respondem rapidamente a contaminação orgânica e algumas delas podem ser utilizadas como indicadores de um enriquecimento nutricional em ambientes aquáticos. (Brandão et al., 2010). As leveduras têm sido utilizadas como indicadores de contaminação por esgoto e da qualidade das águas utilizadas para recreação, como um complemento à contagem de coliformes, utilizados como indicador de poluição fecal (Hagler, 2006).

Brandão et al. (2010) observaram que a maioria das espécies isoladas de lagos da região de Lagoa Santa (Minas Gerais), local com saneamento precário e alta atividade antropogênica, resultando em um alto nível de matéria orgânica, eram fungos oportunistas e em sua maioria associados a contaminação fecal. A maioria das espécies de leveduras isoladas, neste estudo, são comuns em ambientes aquáticos ricos em matéria orgânica, mas provavelmente se originam de ambientes terrestres como solo, restos de plantas, ou lixo contaminado. Espécies do gênero *Candida* foram isoladas em maior quantidade, sendo um grande número delas resistente a antifúngicos utilizados na clínica como anfotericina B e itraconazol.

Yamaguchi et al. (2007) observaram que a média de células formadoras de colônias por mL, tanto de fungos filamentosos como de leveduras, foi significativamente mais elevada em água mineral do que água da torneira, sendo

novamente, as leveduras da espécie *Candida* as mais encontradas. Os autores também relataram a ausência de correlação entre quantidade de leveduras e de coliformes totais nas amostras de água testadas, indicando diferentes fontes de poluição que não seriam detectadas se apenas a contagem de coliformes fosse realizada.

Dos inúmeros isolados de leveduras associados a humanos que já foram encontrados em ambientes de água doce, vários causam infecções invasivas e apresentam risco de morte. Algumas destas, que eram consideradas meras colonizadoras ou contaminantes, causam infecções graves e são resistentes a todos os antifúngicos disponíveis (Medeiros et al., 2008). Estas infecções fúngicas constituem um grave problema em pacientes com a imunidade comprometida, além disso o espectro dos patógenos fúngicos causadores de infecções nestes pacientes têm aumentado (Kanafani & Perfect, 2008).

A resistência de patógenos a drogas antifúngicas vem sendo cada vez mais descrita, o que representa um potencial problema no tratamento de infecções. Apesar dos métodos de diagnóstico e das terapias utilizadas, o resultado de tais infecções são normalmente fatais com mortalidade variando de 50% a 100% quando tratadas e de praticamente 100% em casos não tratados (Hageskal et al., 2009).

A resistência a antifúngicos pode ser primária (intrínseca) ou secundária (adquirida). A primária é encontrada naturalmente em certos fungos sem que tenha havido exposição prévia à droga, como é o caso da *Candida krusei* ao fluconazol. A resistência secundária se desenvolve em organismos previamente suscetíveis a ela após serem expostos ao agente antifúngico, normalmente dependendo de uma alteração na expressão gênica (Kanafani & Perfect, 2008).

## **1.2 Gênero *Candida***

Muitas espécies de fungos são capazes de infectar hospedeiros saudáveis causando doenças que variam de superficiais, como nas mucosas, até doenças mais graves, como infecções disseminadas. Estas infecções são de difícil tratamento pelo fato de os fungos serem eucariotos, assim como as células humanas (Yamaguchi et al., 2007).



As leveduras pertencentes ao gênero *Candida* são as que mais comumente causam infecções fúngicas graves em unidades de tratamento intensivo (UTI), sendo a *Candida albicans* a espécie dentre todas as leveduras com maior número de casos descritos. Candidemia é a quarta infecção sanguínea mais recorrente em pacientes hospitalizados, sendo uma importante causa de mortalidade. Espécies deste gênero normalmente existem como comensais no trato gastrointestinal e genital de hospedeiros saudáveis, mas são patógenos oportunistas com habilidade de causar várias infecções superficiais e sistêmicas. Possuem a propensão de invadir e causar doença quando ocorre um desequilíbrio no corpo humano (Ballal & Vinitha, 2009; Miceli et al., 2011).

Os isolados de *Candida* possuem inúmeros fatores de virulência, como a formação de biofilme, e a produção de enzimas extracelulares como a proteinase e a fosfolipase. Os biofilmes se mantêm por driblar os mecanismos imunes do hospedeiro, por possuírem resistência ao tratamento com antifúngicos e pela sua vantagem na competição com outros organismos. Proteinases extracelulares digerem membranas celulares dos hospedeiros facilitando a adesão e a invasão tecidual nos hospedeiro. Danificam além de células, moléculas do sistema imune do hospedeiro e assim resistem ao seu ataque. As fosfolipases hidrolisam um ou mais ésteres que compõem as membranas celulares, digerindo fosfolipídeos e levando à lise celular (Ballal & Vinitha, 2009).

De acordo com Cury et al. (2007) isolados de *Candida* oportunistas apresentam diferentes perfis de sensibilidade a antifúngicos dependendo da espécie a que pertencem e também diferem entre isolados da mesma espécie. Apesar da *C. albicans* ser a espécie mais comumente encontrada em infecções fúngicas (63-70%), espécies não-albicans têm aumentado bastante sua ocorrência em hospitais. *Candida glabrata* é a segunda espécie mais comum e corresponde a cerca de 44% das infecções, um valor significativo que deve ser considerado (Miceli et al., 2011).

A ocorrência cada vez mais comum de cepas clínicas multirresistentes além das falhas no tratamento das infecções (que são uma consequência do perfil de resistência dos isolados), tornam necessária a descoberta de novos metabólitos com atividade antimicrobiana e com potencial para utilização na clínica. Por isso, atualmente, um crescente número de estudos sobre atividade biológica de metabólitos secundários têm sido realizados, e têm se tornado cada vez mais necessários (Solecka et al., 2012).

### 1.3 Metabólitos Secundários

Metabólitos secundários são moléculas de adaptação que evoluíram para propósitos diferentes daqueles do metabolismo primário. São produzidos pelas espécies por razões fisiológicas, sociais ou predatórias específicas (O'Brien and Wright, 2011). Esses compostos são produzidos sob condições específicas, normalmente após a fase de crescimento dos microrganismos e, dependendo das condições ambientais as quais estão submetidos, uma mesma espécie pode expressar de diferentes metabólitos (Bervanakis, 2008).

A explicação mais aceita do por que microrganismos produzem antibióticos é que estas moléculas fazem com que eles tenham uma grande vantagem adaptativa em ambientes pobres em nutrientes. A habilidade de inibir ou reduzir o crescimento de competidores favorece os produtores destes compostos, desfavorecendo os suscetíveis a eles. Apoiando esta hipótese há a observação de que bactérias ambientais são altamente resistentes a antibióticos (O'Brien and Wright, 2011).

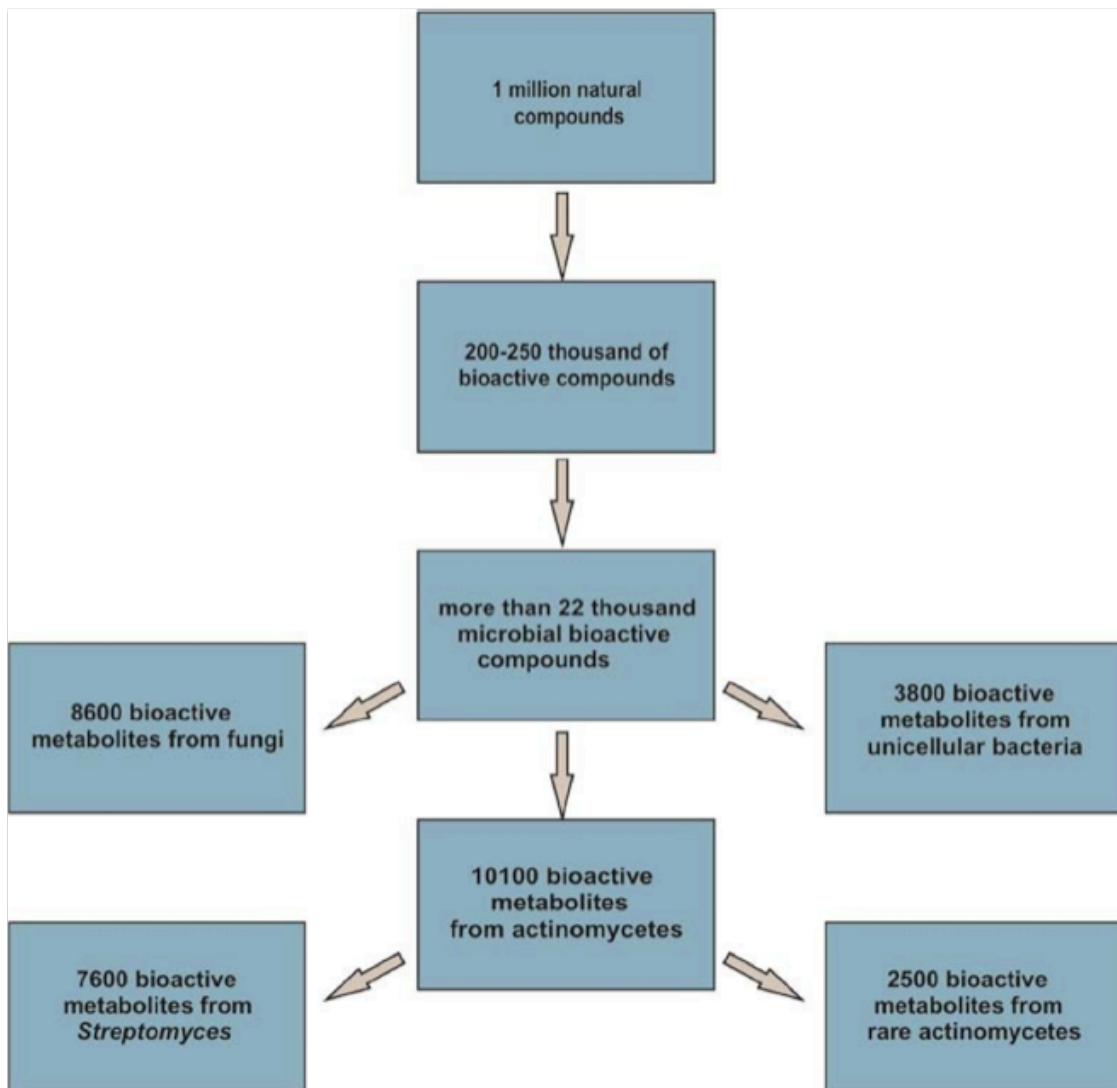
A biossíntese de metabólitos secundários em actinobactérias envolve a seguinte sequência de eventos: 1) captura de nutrientes pela célula e sua conversão em intermediários do metabolismo primário; 2) acúmulo de metabólitos primários e sinalização por moléculas induzindo a produção de metabólitos secundários; 3) metabólitos primários percorrendo rotas para produção de um metabólito secundário específico; 4) produção destes metabólitos secundários é regulada por genes de rotas específicas (Bervanakis, 2008).

Metabólitos secundários produzidos por microrganismos representam uma ampla fonte de compostos com estruturas químicas complexas e potencial atividade biológica. Muitos dos produtos usados atualmente para terapia em animais e humanos, assim como na agricultura, são originados da fermentação de microrganismos ou derivados de modificações químicas de um produto microbiano (Donadio et al., 2002). No tratamento de câncer e doenças infecciosas aproximadamente 60% e 75% das drogas utilizadas, respectivamente, possuem origem natural (Newman et al., 2003).

A grande abundância de diversidade química gerada por produtos de microrganismos tem sido a fonte de maior contribuição para a descoberta de compostos bioativos em programas de *screening* (Bervanakis, 2008). As descobertas de novos metabólitos secundários produzidos por microrganismos é um

desafio que pode levar a grandes avanços quando bem sucedida. A utilização de técnicas moleculares aumenta a eficiência com que um grupo de microrganismos desejados pode ser identificados em amostras ambientais e isolados para estudos (Donadio et al., 2002). Hábitats terrestres são a maior fonte de microrganismos produtores de metabólitos secundários, mas os hábitats marinhos vêm se mostrando uma fonte alternativa promissora, proporcionando a identificação de inúmeros metabólitos com estruturas diferenciadas (Bervanakis, 2008).

Métodos genéticos e técnicas de *screening* permitiram que mais de um milhão de compostos naturais fossem descritos. Destes, 500.000-600.000 produtos são produzidos por plantas e 50.000 são de origem microbiana. Aproximadamente 200.000 a 250.000 apresentam sinais de bioatividade, sendo mais de 22.000 produzidos por microrganismos. Destes 22.000, perto de 17% (3.800) são metabólitos de bactérias (especialmente *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp.); 45% (10.100) são produtos da fermentação de actinomicetos; e 38% (8.600) são de origem fúngica. Entre os actinomicetos, 75% (7.600) dos metabólitos são produzidos por espécies do gênero *Streptomyces* (Solecka et al., 2012). (Figura 1)



**Figura 1.** Distribuição de compostos bioativos já descobertos de acordo com sua origem (Solecka et al., 2012).

#### 1.4 Actinomicetos

Nem todos os microrganismos são igualmente capazes de produzir metabólitos secundários (Donadio et al., 2002). Os membros do grupo dos actinomicetos constituem um grande e importante segmento da microbiota da maioria dos ambientes naturais e se caracterizam por sua grande importância na ciência moderna por serem os maiores produtores de metabólitos bioativos (Shiburaj & Preethi, 2013).

Os actinomicetos, também chamado de actinobactérias, são bactérias Gram-positivas, formadoras de esporo, crescimento de micélio aéreo e no substrato em

meio sólido, e com um alto conteúdo G+C em seu DNA, variando desde aproximadamente 55% a 70% em bactérias do gênero *Streptomyces*. A maioria dos seus genes codifica grandes sequências utilizadas durante sua complexa diferenciação morfológica (Bervanakis, 2008). Apresentam diferentes propriedades fisiológicas e metabólicas, como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma grande variedade de metabólitos secundários, dos quais muitos são potentes antibióticos (Ventura et al., 2007; Genilloud et al., 2011; George et al., 2012; Goodfellow & Fiedler, 2013).

O filo das actinobacterias inclui patógenos, microrganismos que habitam o solo, comensais de plantas, simbiontes fixadores de nitrogênio e colonizadores do trato gastrointestinal. Estão distribuídos em muitos ambientes diferentes, tanto terrestres quanto aquáticos, especialmente no solo, onde tem grande importância na reciclagem de biomateriais por decomposição e formação de húmus (Ventura et al., 2007). Existe também uma grande diversidade de actinomicetos que habita ambientes extremos (Bervanakis, 2008).

Antibióticos originários de actinomicetos e que são atualmente utilizados possuem atividade antibacteriana, antifúngica, anticarcinogênica, antimalária, antiinflamatória, entre outras, sendo que a maioria dos metabólitos secundários que deram origem a estes fármacos foram obtidos unicamente de espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* (Saxena et al., 2013).

## **1.5 Gênero *Streptomyces***

As actinobacterias do gênero *Streptomyces* parecem com fungos pela sua estrutura, pois apresentam arranjos de células ramificados e filamentosos que formam uma rede chamada micélio. Outra semelhança é evidenciada durante a fase de crescimento vegetativo, na qual a replicação do DNA ocorre sem divisão celular, criando a estrutura filamentosa. O gênero *Streptomyces* se reproduz e forma esporos chamados conídios, que são dispersados pelo ambiente. Os esporos são produzidos em filamentos aéreos (esporóforos), que crescem acima da colônia (Panda & Rameshaiah, 2009).

O fato de apresentarem crescimento micelial provavelmente ajuda estes microrganismos na penetração de alguns substratos. As espécies de *Streptomyces*

são extremamente abundantes e importantes no solo, onde são os principais agentes liberadores no ciclo do carbono quando este se encontra preso em detritos orgânicos insolúveis, especialmente de plantas e fungos. Também se destacam por serem a maior fonte de antibióticos naturais e outros metabólitos secundários bioativos, sendo por isso de grande interesse para a medicina e a indústria farmacêutica (Ventura et al., 2008).

Produtos da fermentação de *Streptomyces* são uma rica fonte de compostos que podem ser utilizados como novas drogas com potencial antimicrobiano (Solecka et al., 2012).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de compostos produzidos por isolados de *Streptomyces* contra isolados de leveduras potencialmente oportunistas, oriundas de água de esgoto e resistentes a antifúngicos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Obtenção de extrato centrifugado e extrato bruto contendo metabólitos ativos a partir dos isolados de *Streptomyces*;

Avaliar a atividade dos compostos antifúngicos produzidos pelos isolados de *Streptomyces* à isolados de leveduras de ambiente aquático;

Comparação da concentração inibitória mínima de antifúngicos conhecidos e utilizados na terapia clínica com os extratos produzidos por isolados de *Streptomyces*.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

A ser submetido para a revista **Anais da Academia Brasileira de Ciências**.

#### **Antifungal activity of secondary metabolites produced by actinomycetes against yeast isolates**

Luciana Pasqualini Milagre<sup>1</sup>, Ana Elisa Ballarini<sup>1</sup>, Thaisa Feltrin<sup>1</sup>, Sueli Van Der Sand<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

#### **Corresponding Author**

Dr. Sueli Van Der Sand, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Microbiologia, Rua Sarmiento Leite, 500 – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. CEP: 90050-170, Porto Alegre, Brazil.

Email: [svands@ufrgs.br](mailto:svands@ufrgs.br)

Telephone: (5551) 3308 4505



## ABSTRACT

Yeast communities in aquatic environments are highly diverse, a lot of species being opportunistic pathogens that associate with humans. Several cause invasive infections and may cause death. A number of these strains are resistant to the most antifungals commonly used in humans. Actinobacterias are known for their characteristics to produce different secondary metabolites, a great source of new antimicrobials. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of extracts produced by three actinomycetes against nine aquatic yeasts. The diffusion method in agar wells was done and the inhibition halos formed in the yeasts' growth were measured. Against all yeast isolates tested, the extract from actinobacteria R18(6) inhibited 73% of them. All yeast isolates were inhibited by at least one extract tested. Two of them were inhibited by the three extracts. The minimal inhibitory concentration test was carried out using the centrifuged extract and crude extract. The R18(6) isolate presented greater inhibition against the isolates with the centrifuged extract rather than with the crude extract, however both 6(4) and 6(2) crude extracts were more effective than their centrifuged extracts, inhibiting all yeasts in at least one concentration tested. All actinomycetes' extracts used showed antifungal activity against the aquatic yeasts tested.

**Keywords:** actinomycetes, extracts, MIC, yeast from aquatic environment.

## 1 INTRODUCTION

In recent decades, population growth and the consequent increase of industrial activities have contributed to environmental problems, especially those related to the preservation of ground and surface water. Contamination of water resources is a direct consequence of human actions and is more relevant in highly urbanized areas. Human activities have led to soil erosion and high residue level in rivers and those residues may end up changing water composition, leading to harmful effects on the organisms inhabiting these areas as well as on the human body (Blume et al. 2010).

Bacterial are the most studied group when concerning the quality of drinking water. In the past, fungi were not a concern when water pathogens were discussed. However in more recent years the focus on them has increased and their presence is now considered a chronic problem in water distribution systems (Hageskal et al. 2009).

Yeast communities in aquatic environments are highly diverse and a lot of the species found are opportunistic pathogens. Yeasts respond quickly to organic contamination and some of them can be used as indicators of nutrient enrichment in water (Brandão et al. 2010). Several human-associated yeast strains were found in freshwater environments, and a lot of them are known to cause invasive and life-threatening infections, some being resistant to most available antifungal drugs (Medeiros et al. 2008). Invasive fungal infections are an important issue especially in immunocompromised patients and the spectrum of fungal pathogens causing those infections is growing (Kanafani and Perfect 2008).

Of the fungi that are human pathogens, members of the genus *Candida* are the most frequently recovered from human fungal infections. *Candida albicans*

represents over 80% of the isolates from all forms of human candidiasis in the last two decades, but the number of infections caused by non-*C. albicans* is growing (Barbedo and Sgarbi, 2010; Silva et al. 2012). Candidemia is the fourth most common cause of bloodstream infection in hospitalized patients and an important cause of mortality (Ballal and Vinitha 2009). *C. albicans* usually resides as a commensal in the gastrointestinal and genitourinary tracts and in the oral and conjunctival microbiota, but it can cause infection when the host becomes debilitated or immunocompromised (Spampinato and Leonardi 2013).

*Candida* strains possess a number of virulence factors, such as proteinase, phospholipase, and the production of biofilm, which enable the organism to disseminate haematogenously in susceptible hosts. Extracellular proteinases and phospholipase play a significant role in damaging cell membranes which are made up from lipids and proteins. Proteinase production is considered to enhance the organism's ability to colonize and penetrate host tissues by digesting host cell membranes to facilitate adhesion and tissue invasions. Proteinase damages cells and molecules of the host immune system to avoid or resist antimicrobial attack by the host. Phospholipase hydrolyse one or more ester linkages of glycerophospholipids and digests the components, disrupting the epithelial cell membranes leading to cell lysis (Ballal and Vinitha 2009; Kantarcioglu and Yücel 2002).

Considering the fact that the number of multidrug resistant yeasts is increasing and that the treatment used nowadays fails frequently, the studies of secondary metabolites and its activity is of high interest. In recent decades the number of studies about the biological activity of metabolites are increasing (Bervanakis 2008; Newman 2003; Solecka et al. 2012). Secondary metabolites produced by

microorganisms are an important source of compounds with complex chemical structures and potential biologic activity. A lot of the products used today for the treatment of animals and humans, and also in agriculture, are produced by microorganism fermentation or are chemical modifications that come from a microbial product (Donadio et al. 2002).

Actinomycetes members form a large and important segment of the microbiota of most natural environments and they possess a remarkable place in modern science as the largest producers of bioactive metabolites (Shiburaj and Preethi 2013). Bacteria belonging to this group are characterized by the formation of substrate and aerial mycelium and have a high G+C content in the DNA (55%-70%). The majority of its genes encode large coding sequences used during complex morphological differentiation and secondary metabolite biosynthesis (Bervanakis 2008).

Actinomycetes have different physiological and metabolic properties, such as the production of extracellular enzymes and the formation of a wide variety of secondary metabolites, many of which are potential antibiotics (Ventura et al. 2007; Genilloud et al. 2011; George et al. 2012; Goodfellow and Fiedler, 2010). Among the actinomycetes group, the *Streptomyces* are the largest genus and widely recognized as industrially important organisms for their ability to elaborate different kinds of novel secondary metabolites (Atta 2012).

Considering the fact that yeast strains resistant to the most commonly used antifungals are becoming more and more frequent, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of compounds produced by *Streptomyces* isolates against yeast strains potentially opportunistic isolated from wastewater.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Strains selected

The study was carried out using nine aquatic yeast strains potentially pathogenic that were collected at the Arroio Dilúvio stream in Porto Alegre plus two ATCC (*Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258) used as control in the experiments. The yeast strains selected were characterized previously in our laboratory as being positive for proteinase and phospholipase, which are virulence factors (Feltrin 2014). Three actinomycetes strains, R18(6), 6(4) and 6(2), were obtained from roots of tomato plants (Oliveira et al. 2010). They were selected amongst other actinomycetes isolates available due to the fact that they showed better antifungal activity in previous studies (Oliveira et al. 2010; Minotto 2014). All biological material is available in the Environmental Microbiology Laboratory at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

### 2.2 Extraction of metabolites from *Streptomyces*

Pre-cultures of *Streptomyces* were multiplied for 72h at 30°C in starch casein broth (SC) under standard aeration and agitation conditions (115 rpm). The culture was then centrifuged at 12000 rpm for 10 minutes and the supernatant transferred to another tube. Part of it was separated and called centrifuged extract. To the other part ethyl acetate (1:1) was added for the metabolites extraction. The supernatant was washed with the solvent three times and the two phases that resulted, aqueous and organic, were separated using a decantation funnel. The organic phase, after concentration, was called crude extract.

### **2.3 Concentration of the crude extract**

The organic phase was dried in a rotary evaporator. It creates a low-pressure environment and provides a continuous rotation so that the solvent evaporates, leaving only the concentrated metabolites. Phosphate buffered saline (PBS) was added to it and both extracts were frozen for further tests.

### **2.4 Evaluation of antifungal activity**

Antifungal activity was determined by the diffusion method in agar wells. First 100  $\mu\text{L}$  of yeast suspension ( $1 \times 10^6$  cels/mL – 0,5 in McFarland scale) was spread in the medium YMA (Yeast Malt Agar, 20 mL/plate) surface. Using a cylinder with 9 mm, six wells were made in the medium and in each one 100  $\mu\text{L}$  of the actinomycetes centrifuged extract were added. The plates were incubated for 18 h at 4°C for metabolites diffusion in the medium and then for 48h at 35°C for yeast growth and halo formation. The presence or absence of halos was evaluated. The test was made in duplicate.

### **2.5 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)**

The test was made according to the protocol of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI M27-A2 2002). Microdilution plates with 96 wells were used and the two ATCC isolates previously described were included as controls in the experiment. To the wells it was initially added 100  $\mu\text{L}$  of RPMI-1640 medium and then a serial dilution was made using 100  $\mu\text{L}$  of the antifungal agents, the centrifuged extract or the crude extract. For amphotericin B, ketoconazole, itraconazole, and voriconazole, the final concentrations in the wells ranged from 0,0313 to 16  $\mu\text{g/mL}$  and for fluconazole it ranged from 0,125 to 64  $\mu\text{g/mL}$ . The yeast cultures were

prepared using colonies grown in Sabouraud medium for 24 h. A yeast suspension was made in saline solution (0,85%) with  $10^6$  cels/mL (0,5 in the McFarland scale). Two dilutions of the suspensions were prepared 1:50 and 1:20, resulting in the final concentration of  $1.0 \times 10^3$  to  $5.0 \times 10^3$  cels/mL. When added to the wells already containing medium plus antifungals or extracts, they reached the desired concentration of  $0,5 \times 10^3$  to  $2,5 \times 10^3$ . The plates were incubated for 48 h at 35°C. As negative control there were wells containing only medium or medium plus extract. The positive control wells contained medium and yeast cells, without the antifungal agent or one of the extracts. All isolates were tested in duplicates.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

The secondary metabolites produced by actinomycetes have the ability to inhibit a large number of microorganisms as it was shown in many previous studies (Ventura et al. 2007; Genilloud et al. 2011; George et al. 2012; Goodfellow and Fiedler 2010).

The yeast isolates used in this work were selected due to the presence of virulence factors. It was shown in previous studies that the isolates selected have both phospholipase and proteinase enzymes, which makes them possible pathogens for humans, and also some of them are resistant to antifungal agents commonly used in human treatment (Feltrin 2014). Several studies analyzed the presence of hydrolytic enzymes, such as proteinase and phospholipase, mostly in *Candida* species, because they facilitate the host infection. Proteinase and phospholipase are

considered virulence factor and they help invading and colonizing the host tissue (Mohan and Ballal 2008; Silva et al. 2012; Mattei et al. 2013; Sardi et al. 2013).

In order to find out if the actinomycetes strains actually had the ability to inhibit the yeasts' growth, the diffusion method in agar wells was done using only the centrifuged extract produced by the actinomycetes. The three centrifuged extracts from isolates R18(6), 6(4) and 6(2) were tested against the yeast isolates and all yeasts were inhibited by at least one of the extracts (Fig. 1).

The extract from the actinomycete R18(6) was the one that inhibited 73% of the yeast isolates, including one of the ATCC strains. The ones that were not susceptible to R18(6) were inhibited by the centrifuged extract produced by 6(4) and 6(2) isolates. Two of the yeast isolates tested, 1B3 and 2A8, were susceptible to all three different extracts (Table 1).

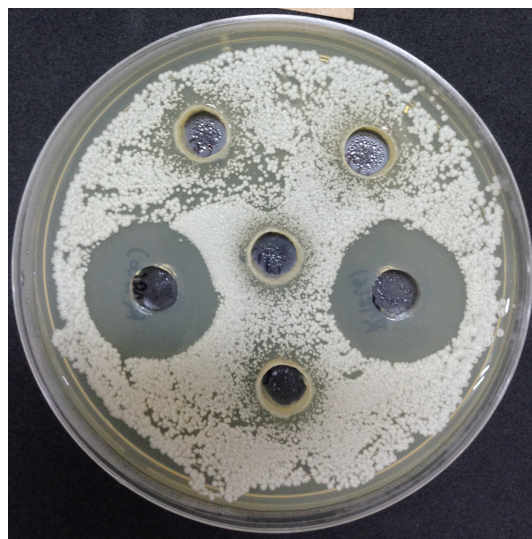


Fig. 1 – Inhibition halo formed by the isolate R18(6) in the diffusion method using agar wells against the yeast isolate (2)1A9 in YMA medium.



Table 1 – Inhibition of yeast isolates growth due to the activity of the centrifuged extract of each actinomycete isolate used in the assay.

	R18(6)	6(4)	6(2)
ATCC C.P.	+	-	-
ATCC C.K.	-	+	+
1B3	+	+	+
2A8	+	+	+
2C5	+	-	-
(2)1A9	+	-	-
(2)2B5	+	-	-
(2)2B10	-	+	+
(2)2C6	+	-	-
(2)2C8	-	+	+
(2)3A23	+	-	-

ATCC C.P.: *Candida parapsilosis* ATCC 22019; ATCC C.K.: *Candida krusei* ATCC 6258.

+ presence of halo; - absence of halo.

The minimal inhibitory concentration test was done first with antifungals that are commonly used in clinic therapy - amphotericin B, ketoconazole, itraconazole, voriconazole and fluconazole (Table 2). According to Sanglard and Odds (2002) only a small number of antifungal classes are available for treating serious mycoses, based on their chemistry and antifungal action. Amphotericin B is the most widely used antifungal belonging to the polyenes' group, and it interacts with the ergosterol in fungal membranes altering its permeability. Among the triazoles, which specifically inhibit ergosterol biosynthesis, are fluconazole, itraconazole, ketoconazole, and voriconazole – a novel triazole. Fluconazole is the market leader for treatment of disseminated candida infections, but the rapid increase of azole resistance in oral candida isolates in patients with AIDS, calls the attention to this problem that can become bigger in situations where sufficient yeast numbers experience the appropriate selective pressures (Sanglard and Odds 2002).

Table 2 – Minimal inhibitory concentration assay with the antifungal agents used commonly in the clinic therapy against the yeast isolates. The interpretation of values follows the CLSI M27-A2 (2002).

	AMPB	KET	ITR	VOR	FLU
ATCC C. P.	0,5	0,06	0,12	0,06	2
ATCC C. K.	1	0,5	0,5	0,5	32
1B3	0,12 S	0,06 S	0,5 SDD	0,12 S	16 R
2A8	0,12 S	0,12 S	0,06 S	0,06 S	4 SDD
2C5	0,5 S	0,12 S	2 R	0,25 SDD	8 R
(2)1A9	0,03 S	0,06 S	0,12 S	0,12 S	4 SDD
(2)2B5	0,5 S	0,03 S	0,12 S	0,03 S	0,5 S
(2)2B10	0,06 S	0,12 S	0,12 S	0,25 SDD	4 SDD
(2)2C6	0,25 S	0,25 S	2 R	0,5 SDD	16 R
(2)2C8	0,12 S	0,25 S	1 R	0,5 SDD	32 R
(2)3A23	0,25 S	0,03 S	0,12 S	0,03 S	0,5 S

AMPB=amphotericin B; KET=ketoconazole; ITR=itraconazole; VOR=voriconazole; FLU=fluconazole.

S=susceptible; SDD=susceptible dose-dependent; R=resistant.

ATCC C.P.: *Candida parapsilosis* ATCC 22019; ATCC C.K.: *Candida krusei* ATCC 6258.

The antifungals were used looking for a comparison of its inhibitory concentration with the concentration of the extracts that could be able to inhibit the yeasts growth and also if resistant strains could be inhibited by the actinomycetes extracts.

Most of the yeasts isolates used in this study were susceptible to the antifungals tested. Resistance was observed with fluconazole and itraconazole. Of the nine aquatic yeast isolates selected four were resistant to fluconazole and three were resistant to both of them. All isolates were susceptible to amphotericin B and ketoconazole. However to voriconazole there were four of them that presented dose-dependent susceptibility.

Table 3 shows the results obtained in the minimal inhibitory concentration assay using the centrifuged extract from the actinomycete R18(6) and the yeast isolates and table 4 shows us the results using the same yeast strains but with the crude

extract of R18(6) isolate. When comparing the inhibition results obtained with the centrifuged and crude extracts of R18(6) isolate in those two tables, we can clearly see that the inhibition was greater when using the centrifuged extract. Usually the opposite is expected due to the fact that after the extraction, using ethyl acetate, the crude extract would be cleaner and so it would have a higher concentration of the metabolite and so improve the activity against the yeasts. About this result two hypothesis can be made: one is that in the centrifuged extract there were still cells left behind so they could produce the secondary metabolite and have a greater inhibition; the other one is that the metabolite produced by the R18(6) that inhibits yeast is more than one compound, with a synergic action, and one of them is lost in the extraction procedure.

Table 3 – Minimal inhibitory concentration assay using the centrifuged extract of R18(6) strain against the yeast isolates.

	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Inoculum
<b>ATCC C.P.</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>ATCC C.K.</b>	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+
<b>1B3</b>	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+
<b>2A8</b>	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>2C5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>(2)1A9</b>	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+
<b>(2)2B5</b>	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
<b>(2)2B10</b>	±	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+
<b>(2)2C6</b>	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
<b>(2)2C8</b>	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+
<b>(2)3A23</b>	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+

+ presence of cellular growth, ± reduced cellular growth, - absence of cellular growth.

**ATCC C.P.:** *Candida parapsilosis* ATCC 22019; **ATCC C.K.:** *Candida krusei* ATCC 6258.

Table 4 – Minimal inhibitory concentration assay using the crude extract of R18(6) against the yeast isolates.

	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Inoculum
<b>ATCC C.P.</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>ATCC C.K.</b>	-	-	-	-	-	-	+	±	±	+	+
<b>1B3</b>	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+
<b>2A8</b>	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>2C5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+
<b>(2)1A9</b>	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2B5</b>	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2B10</b>	±	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+
<b>(2)2C6</b>	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2C8</b>	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+
<b>(2)3A23</b>	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ presence of cellular growth, ± reduced cellular growth, - absence of cellular growth.

**ATCC C.P.:** *Candida parapsilosis* ATCC 22019; **ATCC C.K.:** *Candida krusei* ATCC 6258.

Tables 5 and 6 showed the centrifuged and crude extract of 6(4) respectively. For this isolate the crude extract presented a higher inhibition when comparing with the centrifuged extract.

According to Solecka et al (2012) antagonistic activity against fungal pathogens is usually related to various antifungal substances produced by *Streptomyces* spp. as well as to extracellular hydrolytic enzymes that are involved in the lysis of the fungal cell wall.

Table 5 – Minimal inhibitory concentration assay using the centrifuged extract of 6(4) against the yeast isolates.

	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Inoculum
<b>ATCC C.P.</b>	-	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+
<b>ATCC C.K.</b>	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+	+
<b>1B3</b>	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>2A8</b>	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>2C5</b>	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)1A9</b>	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2B5</b>	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2B10</b>	-	-	-	-	±	±	±	±	+	+	+
<b>(2)2C6</b>	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2C8</b>	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)3A23</b>	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+

+ presence of cellular growth, ± reduced cellular growth, - absence of cellular growth.

**ATCC C.P.:** *Candida parapsilosis* ATCC 22019; **ATCC C.K.:** *Candida krusei* ATCC 6258.

Table 6 – Minimal inhibitory concentration assay using the crude extract of 6(4) against the yeast isolates.

	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Inoculum
<b>ATCC C.P.</b>	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+
<b>ATCC C.K.</b>	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+
<b>1B3</b>	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+
<b>2A8</b>	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+	+
<b>2C5</b>	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+
<b>(2)1A9</b>	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2B5</b>	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2B10</b>	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2C6</b>	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2C8</b>	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+
<b>(2)3A23</b>	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+

+ presence of cellular growth, ± reduced cellular growth, - absence of cellular growth.

**ATCC C.P.:** *Candida parapsilosis* ATCC 22019; **ATCC C.K.:** *Candida krusei* ATCC 6258.

Tables 7 and 8 show the results for the centrifuged and crude extract of 6(2), respectively. Once again the inhibition was greater with the crude extract, suggesting a higher concentration of the compound than in the centrifuged extract.

Table 7 – Minimal inhibitory concentration assay using the centrifuged extract of 6(2) against the yeast isolates.

	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Inoculum
<b>ATCC C.P.</b>	-	-	±	±	±	±	±	+	+	+	+
<b>ATCC C.K.</b>	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+
<b>1B3</b>	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>2A8</b>	-	-	±	±	±	±	±	+	+	+	+
<b>2C5</b>	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+
<b>(2)1A9</b>	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2B5</b>	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2B10</b>	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2C6</b>	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2C8</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)3A23</b>	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ presence of cellular growth, ± reduced cellular growth, - absence of cellular growth.

**ATCC C.P.:** *Candida parapsilosis* ATCC 22019; **ATCC C.K.:** *Candida krusei* ATCC 6258.

Table 8 – Minimal inhibitory concentration assay using the crude extract of 6(2) against the yeast isolates.

	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Inoculum
<b>ATCC C.P.</b>	-	-	-	±	±	±	±	+	+	+	+
<b>ATCC C.K.</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+
<b>1B3</b>	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+
<b>2A8</b>	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>2C5</b>	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+
<b>(2)1A9</b>	-	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2B5</b>	-	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2B10</b>	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+
<b>(2)2C6</b>	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)2C8</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>(2)3A23</b>	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+

+ presence of cellular growth, ± reduced cellular growth, - absence of cellular growth.

**ATCC C.P.:** *Candida parapsilosis* ATCC 22019; **ATCC C.K.:** *Candida krusei* ATCC 6258.

Some yeast isolates, which did not form halos in the diffusion method with agar wells were inhibited in higher concentrations by the extracts in the MIC assay. That could be explained because the extract concentration in the medium after its diffusion was not as high as the concentrations tested in the MIC assay, it was more of an indirect activity which is different from when the extract was put directly in

contact with the yeast cells in the MIC assay. The agar could also have reduced the amount of extract that actually was in contact with the yeast culture since it only grows in the surface while the extract diffuses also in the depth of the medium. That was the case with 2C5 isolate, it did not form halos when tested against 6(4) and 6(2) centrifuged extracts but it was inhibited by those same extracts in the MIC test with higher concentrations.

On the other hand, when comparing the results for the two different tests done with the R18(6) extract, the two yeast isolates that did not form halos in agar plates, (2)2B10 and (2)2C8, also grew in every well in the MIC test.

In this study it was possible to observe that the yeast isolates resistant to at least one antifungal used were all susceptible to one or more of the extracts tested. Isolate 2C5, for example, resistant to both fluconazole and itraconazole, was inhibited by all extracts tested. When tested against R18(6) it showed a considerably greater inhibition, it did not grow even in the smallest extract concentration.

Most of the extracts inhibited the yeasts growth at around the same concentration as the triazoles antifungals, itraconazole, voriconazole and fluconazole, and were completely different than amphotericin B, for example, a polyene antifungal drug. Taking into account that amphotericin B is the only antifungal tested that is a fungicidal agent, it is possible to suggest that the extracts tested have a different mechanism to inhibit yeasts growth than amphotericin B, they looked more as though they had a fungistatic action. Hawser and Islam (1999) studied laboratory and clinical yeast strains against fungistatic and fungicidal antifungals, and propose a morphogenic transformation assay which would greatly assist in the characterization of new antifungal agents and may better distinguish fungicidal than fungistatic action. Amphotericin B disrupts membrane or cell wall

integrity, being more effective than azoles, which inhibit cytochrome P450 demethylase.

The aim of this study was to evaluate the activity of compounds produced by *Streptomyces* isolates against yeast from aquatic environment and we could conclude that the extracts have antifungal activity against most of the strains tested. It becomes more and more necessary to discover new antifungal drugs due to the resistance that yeasts end up developing against most of the ones used in clinical environments. Further studies would be important to find out more about the extracts tested in this work, since they have the potential to inhibit yeast strains that showed resistance to some of the antifungals used. Purification and characterization of these antimicrobials must be carried out.



## REFERENCES

- Atta, H. M. 2012. Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society*.
- Augustine S K, Bhavsar S P and Kapadnis B P. 2005. Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. *Indian J Med Res* 121: 164–170.
- Ballal M and Vinitha M. 2009. Activity of proteinase, phospholipase and biofilm as virulence markers in *Candida* species isolated from haematogenous samples. *The Journal of Hospital Infection* 73(1) 94–95.
- Barbedo L S and Sgarbi D B G. 2010. *Candidíase*. *J bras Doenças Sex Transm* 22(1): 22–38.
- Bervanakis G. 2008. Detection and Expression of Biosynthetic Genes in Actinobacteria. A thesis submitted for the degree of Masters of Science. Department of Medical Biotechnology School of Medicine, Faculty of Health Sciences. Flinders University.
- Blume K K, Macedo J C and Meneguzzi A, Silva L B, Quevedo D M, Rodrigues M A S. 2010. Water quality assessment of the Sinos River, Southern Brazil. *Braz J Biol* 70(4): 1185–1193.
- Brandão L R, Medeiros A O, Duarte M C, Barbosa A C and Rosa C A. 2010. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil. *Journal of Water and Health* 8(2): 279–289.

CLSI 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard M27-A2.

Donadio S, Monciardini P, Alduina R, Mazza P, Chiocchini C, Cavaletti L, Margherita S and Puglia A M. 2002. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J Biotechnol* 99: 187–198.

Feltrin T. 2014. Ocorrência de Leveduras Oportunistas em Amostras de Água do Arroio Dulúvio em Porto Alegre. Dissertação – Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Genilloud O, González I, Salazar O, Martín J, Tormo J R and Vicente F. 2011. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 375–89.

George M, Anjumol A, George G and Hatha A A M. 2012. Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *Afr J Microbiol Res* 6(10): 2265–2271.

Goodfellow M and Fiedler H-P. 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek* 98: 119–142.

Hageskal G, Lima N and Skaar I. 2009. The study of fungi in drinking water. *Mycological Research* 113: 165–172.

Hawser S and Islam K. 1999. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemoth* 43: 411–413.

Kanafani Z A and Perfect J R. 2008. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases* 46: 120–128.

Kantarcioglu A S and Yücel A. 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 165: 160–165.

Mattei A S, Alves S H, Severo C B, Guazzelli L S, Oliveira F M and Severo L C. 2013. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46(3): 340–342.

Medeiros A O, Koelher L M, Hamdan J S, Missagia B S, Barbosa F A R and Rosa C A. 2008. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water Research* 42: 3921–3929.

Minotto E. 2014. Caracterização parcial de compostos bioativos produzidos por actinomicetos com potencial para utilização no biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. Tese – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Mohan das V, Ballal M. 2008. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 25: 208–210.

Newman D J, Cragg G M, Snader K M. 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period of 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66: 1022–1037.

Oliveira M F, Silva M G, Sand S V D. 2010. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology* 161: 565–572.

Sanglard D and Odds F C. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *THE LANCET Infectious Diseases* 2: 73–85.

Sardi J C O, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida A M and Giannini M J S M. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 62: 10–24.

Saxena A, Upadhyay R, Kumar D and Kango N. 2013. Isolation, antifungal activity and characterization of soil actinomycetes. *J Sci Ind Res* 72: 491–497.

Shiburaj S and Preethi S. 2013. Phylogenetic Analysis of Few Actinobacteria with Potential Antimicrobial Properties, Isolated from the Forest Soils of Western Ghats of Kerala. *Prospects in Bioscience: Addressing the Issues* 159–167.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D W and Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 36: 288–305.

Solecka J, Zajko J, Postek M and Rajnisz A. 2012. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Cent Eur J Biol* 7(3): 373–390.

Spampinato C and Leonardi D. 2013. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International* 2013: 1–13.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald G F, Chater K F and Sinderan D V. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(3): 495–548.

#### 4 CONCLUSÃO

Os extratos centrifugados e brutos, obtidos a partir de culturas dos isolados R18(6), 6(4) e 6(2) de *Streptomyces*, apresentaram atividade antifúngica à leveduras potencialmente oportunistas, isoladas de ambiente aquático.

O extrato centrifugado do isolado R18(6) apresentou atividade antifúngica no teste da concentração inibitória mínima à todos os isolados de leveduras contra os quais havia formado halos no teste de difusão em poços no ágar.

Os extratos brutos dos isolados 6(4) e 6(2) apresentaram atividade antifúngica e inibiram todos os isolados de leveduras de ambiente aquático testados em pelo menos uma das concentrações testadas no teste de concentração inibitória mínima (CIM).

Observou-se que as concentrações dos extratos, que apresentaram inibição aos isolados de leveduras, quando comparados com as concentrações inibitórias dos antifúngicos utilizados na terapia clínica, se aproximavam mais dos antifúngicos triazóis e ficavam mais distantes da classe dos polienos, tendo como representante a anfotericina B.

## 5 PERSPECTIVAS

Purificação dos extratos testados através de técnicas de cromatografia de gel filtração ou troca-iônica.

Identificação da molécula ativa produzida pelos isolados de *Streptomyces* responsável pela inibição das leveduras testadas utilizando espectrometria de massas.

Sequenciamento dos isolados de leveduras para identificações mais precisa de gênero e espécie.

Identificação a nível de espécie dos isolados de *Streptomyces* R18(6), 6(4) e 6(2).

## REFERÊNCIAS ADICIONAIS

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 208–215, abr. 2005.

BONDARYK, M.; KURZAŃKOWSKI, W.; STANISZEWSKA, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, n. 5, p. 293–301, out. 2013.

CAO, L. et al. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 425–430, jan. 2004.

CIRAK, M. Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S. Use of Molecular Methods in Identification of *Candida* Species and Evaluation of Fluconazole Resistance. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1027–1032, 2003.

DIONISIO, L. P. C.; RHEINHEIMER, G.; BORREGO, J. J. Microbiological Pollution of Ria Formosa (South of Portugal). **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 186–193, fev. 2000.

DONADIO, S. et al. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 187–198, 2002.

HAGLER, A. N. Yeasts as Indicators of Environmental Quality. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Chapter 21, p. 515–532.

HUANG, M.; KAO, K. C. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 333, p. 85–93, ago. 2012.

JORDÃO, C. P. et al. Environmental assessment of water-courses of the Turvo Limpo River basin at the Minas Gerais State, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 127, p. 315–326, abr. 2007.



- LATTIF, A. A. Molecular typing and in vitro fluconazole susceptibility of *Candida* species isolated from diabetic and nondiabetic women with vulvovaginal candidiasis in India. **Journal of Microbiology**, v. 44, p. 166–171, jun. 2011.
- LIM, C. S.-Y. et al. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 21–31, jan. 2012.
- LIU, Q. et al. Antagonism and Action Mechanism of Antifungal Metabolites from *Streptomyces rimosus* MY02. **Journal of Phytopathology**, v. 157, p. 306–310, maio 2009.
- MCDONALD, R. I. et al. Urban growth, climate change, and freshwater availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 15, p. 6312–6317, 12 abr. 2011.
- MEDEIROS, A. O. et al. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. **Water Research**, v. 42, p. 3921–3929, ago. 2008.
- MEISEN, M. N. et al. Análise da Correlação da Ocorrência de Doenças Diarréicas Agudas (DDA) com a Qualidade da Água para Consumo Humano no Município de Pouso Redondo - SC. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 13, n. 2, p. 57–67, 2011.
- MENDES, T. D. et al. Anti-*Candida* Properties of Urauchimycins from Actinobacteria Associated with *Trachymyrmex* Ants. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 835081, jan. 2013.
- MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 142–151, fev. 2011.
- O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 552–558, ago. 2011.
- PANDA, T.; RAMESHAIAH, G. N. Application of Actinobacterial and Fungal

Morphology on the Design of Operating Strategies in Bioprocess Development. **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, p. 31–39, 2 abr. 2009.

PENHA, S. S. et al. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 119–122, 2000.

PEREIRA, V. J. et al. Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources. **Water Research**, v. 43, p. 3813–3819, ago. 2009.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1A, p. S3–S13, jan. 2012.

SALAMONI, S. P. et al. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1847–1856, 5 mar. 2010.

SANGLIER, J. J. et al. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). **Research in Microbiology**, v. 144, p. 633–642, out. 1993.

SARDI, P. et al. Isolation of Endophytic *Streptomyces* Strains from Surface-Sterilized Roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2691–2693, 1992.

SILVA, V.; DÍAZ, M. C.; FEBRÉ, N. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. **Medical Mycology**, v. 42, p. 333–339, jan. 2004.

STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257–268, mar. 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

TAY, S. T. et al. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and anti

fungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. **Medical Mycology**, v. 49, p. 556-560. jul 2011

THERON, J.; CLOETE, T. E. Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1–26, jan. 2002.

TOKALA, R. K. et al. Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2161–2171, 2002.

UNITED NATIONS- WATER (UNWATER), 2014 em: [www.unwater.org](http://www.unwater.org)

WOOLLETT, L. L.; HEDRICK, L. R. Ecology of yeasts in polluted water. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 36, p. 427–435, jan. 1970.

YAMAGUCHI, M. U. et al. Yeasts and Filamentous Fungi in Bottled Mineral Water and Tap Water from Municipal Supplies. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1–9, 2007.