

INFLUÊNCIA NUTRICIONAL DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces* sp.

Themis Collares Antunes¹; Sabrina Pinto Salamoni²; Ana Paula Guedes Frazzon³, Sueli T. Van Der Sand³

¹Estudante do Curso de Biologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde; e-mail: themiscollares@yahoo.com.br; ²Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e-mail: sabrinapinto.salamoni@gmail.com; ³Professora do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde.. e-mail: svands@ufrgs.br; ana.frazzon@ufrgs.br.

Resumo: Os estreptomicetes são bactérias caracterizadas por sua habilidade em formar hifas. São amplamente distribuídos no ambiente e conhecidos pela produção de moléculas biologicamente ativas. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de seis isolados de *Streptomyces* frente a dezenove cepas de *Enterococcus* spp. Os estreptomicetos pertencem à bacterioteca do laboratório de microbiologia e foram identificados através de provas morfológicas, bioquímicas e molecular. 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 (AC) à temperatura de 30°C por sete dias, em agitação constante. Após crescimento, a cultura foi filtrada para extração do extrato bruto teste. 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. Como perspectiva pretende-se realizar a separação dos compostos através de cromatografia em camada delgada e identificação molecular do isolado selecionado.

Palavras-Chave: actinomicetes; resistência a antibióticos; cocos gram positivas.

Introdução

Os actinomicetos correspondem a um grande grupo de bactérias gram-positivas que apresentam um crescimento de micélio aéreo e sobre o substrato ramificado. Tais bactérias são aeróbias, com alto teor de Guanina e Citosina em seu DNA, sendo encontradas em ambientes diversos, principalmente no solo. Os actinomicetos têm como propriedade mais notável a produção de compostos bioativos de relevância farmacêutica e agrícola. Estima-se que cada linhagem de actinomicetos tenha potencial genético para produzir de dez a vinte metabólitos secundários (Valan, 2009). Tais compostos se caracterizam por serem metabólitos secundários produzidos geralmente na fase tardia do seu desenvolvimento, dentre esses se encontram os antimicrobianos. Em alguns estudos, cerca de 50% de todos os *Streptomyces* isolados demonstraram serem produtores de tal substância (Madigan, 2004).

Considerando-se a grande importância médica e econômica dos antibióticos de estreptomicetos, esse trabalho tem como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de seis isolados de *Streptomyces* contra dezenove de *Enterococcus* multiresistentes de origem ambiental e clínica.

Material e Métodos

O perfil de susceptibilidade a antibióticos dos isolados de *Enterococcus* foi determinado através da técnica de difusão de discos em ágar, conforme determinado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - CLSI (2007). Os antibióticos empregados para a realização deste teste foram: ampicilina (AMP), cefoxitina (CFO), ciprofloxacino (CIP), clorofenicol (CLO), eritromicina (ERI), imipenem (IMP), nitrofurantoína (NIT), norfloxacin (NOR), penicilina (PEN), tetraciclina (TET) e vancomicina (VAN).

A atividade antimicrobiana dos seis isolados de *Streptomyces* foi realizada através da técnica de sobrecamada com inoculação em meio ágar amido caseína (ACA) onde os microorganismos cresceram por 10 dias a temperatura de 30°C. Posteriormente, 1 mL de uma suspensão de 10⁹ células/mL de *Enterococcus* foi adicionada a 9 mL de Müller Hinton e vertido sobre as placas seguindo uma incubação por 48h a temperatura de 37°C. A inibição microbiana foi observada determinando a formação de área de inibição de crescimento do antagonista.

Os isolados que apresentaram atividade efetiva foram cultivados em cultura submersa em meio amido caseína (AC) por 48h a 30°C, sob agitação constante. Após crescimento, a cultura foi filtrada para posterior ensaio de atividade antimicrobiana pela técnica da difusão em poço.

O isolado que apresentou maior atividade antimicrobiana em menor tempo foi crescido durante cinco dias sob diferentes fontes de carbono (amido, glicerol, sacarose e glicose). As amostragens de tempo utilizadas para a obtenção do extrato-bruto teste a ser usado na técnica de difusão em poço foram: P.I. (pré-inóculo), 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas. Determinada a melhor fonte de carbono, o mesmo isolado foi crescido sob diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de potássio, peptona, extrato de levedura e amônio sulfato). A metodologia empregada foi igual a utilizada para as fontes de carbono.

Resultados e Discussão

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%).

No ensaio de dupla camada os seis isolados de *Streptomyces* foram efetivos contra os *Enterococcus* spp. ambientais. Das amostras clínicas, apenas o isolado 155 de *Enterococcus* spp. não apresentou inibição por nenhum isolado de *Streptomyces*.

O extrato bruto do isolado 8S de *Streptomyces* mostrou maior atividade antimicrobiana contra *Enterococcus* spp., apresentando halos de inibição com valor mínimo e máximo de 23 cm e 37 cm.

Por ser preponderante sobre os outros isolados de *Streptomyces* sp., o isolado 8S foi selecionado para otimização do seu extrato bruto em diferentes fontes de carbono. A melhor atividade antibiótica ocorreu na presença do amido com formação de halos de 20-25 cm em 72 horas. A produção de metabólitos com atividade antimicrobiana foi notada a partir do pré-inóculo 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. A produção sob glicerol foi presente apenas 48 horas pós-inoculação tendo maior atividade em 72 horas. Mesmo com crescimento celular presente, a formação de halos perante glicose como fonte de carbono. No ensaio sob diferentes fontes de nitrogênio, o nitrato de potássio mostrou melhor ação em menor tempo do que as outras fontes de nitrogênio utilizadas.

No pré-inóculo não houve formação de halos quando o nitrogênio era oriundo de extrato de levedura. Os extratos compostos por sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona apresentaram início de 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.

Conclusões

No presente estudo, todos os isolados de *Streptomyces* apresentaram atividade contra *Enterococcus* sp., sendo o isolado 8S o microrganismo que mostrou maior espectro de atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana do isolado 8S foi melhor perante amido e nitrato de potássio como fontes de crescimento de carbono e nitrogênio respectivamente. Concluímos que a fonte de carbono e nitrogênio pode influenciar na capacidade de produção de metabólitos secundários.

Apoio

CAPES

Referências

M. Valan Arasu, V. Duraipandiyan, P. Agastian, S. Ignacimuthu. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* ssp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale* V. 19, p.22-28, 2009.

Madigan, Michael T. *Microbiologia de Brock*. 10ª edição. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2004. XIV.