

Avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano de *Streptomyces* sp G-27 contra microrganismos de interesse clínico

Hanna Katarina Lopes Ferreira*, Suellen Emilliany Feitosa Machado, Raphael Carlos Ferrer de Santana, Luiz Eduardo Felix de Albuquerque, Isllan D'Eric Gonçalves da Silva, Glêzia Renata da Silva-Lacerda, Janete Magali de Araújo, Gláucia Manoella de Souza Lima

Universidade Federal de Pernambuco. Campus Recife. Av. Professor Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária. Recife-PE. Brasil. (CEP 50670-901). *E-mail: hannakatarina0@gmail.com.

Resumo. Actinobactérias ou actinomicetos são bactérias filamentosas gram-positivas, normalmente isoladas do solo e que constituem um dos maiores filos bacterianos. Possuem grande potencial biotecnológico, pois são reconhecidamente produtoras de enzimas, pigmentos, substâncias com ações antibióticas, antitumoral, anti-helmíntica e antifúngica, entre outros. Apesar da resistência aos antimicrobianos ser considerada um fenômeno natural de adaptação dos microrganismos às drogas, o surgimento de cepas resistentes conduz à ineficácia da terapia medicamentosa. A resistência antimicrobiana é encarada como desafio e, nesse contexto, a exploração dos produtos naturais apresenta-se como alternativa para a descoberta de novos fármacos antimicrobianos e, conseqüentemente, para o combate a esse tipo de resistência. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial antimicrobiano da cepa *Streptomyces* sp G-27 frente a microrganismos de interesse clínico. O microrganismo foi cultivado em ágar ISP-2, a 37 °C, durante 120 h. Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados em bloco de gelose, medindo 8 x 8 mm de diâmetro, frente à bactérias gram-positivas, gram-negativas e levedura. Para estes microrganismos, foram preparadas suspensões com densidade de 0,5 da Escala de McFarland, que foram semeadas em placas contendo Ágar Mueller Hinton para bactérias e Ágar Sabouraud para a levedura. Os blocos de gelose foram colocados sobre as placas inoculadas, as quais foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias e a 30 °C por 48 h para a levedura. O ensaio foi realizado em triplicata. Após o período de cultivo, o diâmetro dos halos foi medido e os resultados foram obtidos pela média aritmética das triplicatas. *Streptomyces* sp G-27 apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*. Observou-se que a actinobactéria testada possui atividade antimicrobiana contra cinco dos seis microrganismos teste utilizados, revelando perspectivas sobre o potencial biotecnológico de tal microrganismo, que foi isolado da Caatinga, uma região de microbiota pouco explorada.

Recebido:
11/08/2016

Aceito:
27/12/2016

Publicado:
31/12/2016



Acesso Aberto
Artigo completo



ORCID

- 0000-0002-3252-5421
Hanna Katarina Lopes
Ferreira
- 0000-0001-5608-1768
Suellen Emilliany
Feitosa Machado
- 0000-0003-2533-6195
Raphael Carlos Ferrer
de Santana
- 0000-0002-0220-2197
Luiz Eduardo Felix de
Albuquerque

Palavras-chave: *Streptomyces* sp; Metabólitos secundários; Atividade antimicrobiana.

Abstract. Actinobacteria or Actinomycetes are filamentous gram-positive bacteria, usually isolated from soil and constitute one of the major bacterial phyla. They have great biotechnological potential, because they are known as producers of enzymes, pigments, substances with antibiotic action, antitumor, anthelmintic and antifungal producers, among others. Despite the resistance to antimicrobials is considered a natural phenomenon of adaptation of microorganisms to drugs, the emergence of resistant strains leads to ineffectiveness of drug therapy. Antimicrobial resistance is seen as a challenge and, in this context, the use of natural products appear as an alternative to the discovery of new antimicrobial drugs and, consequently, to combat this type of resistance. This work aimed to investigate the antimicrobial potential of the strain *Streptomyces* sp G-27 against interest clinical microorganisms. The microorganism was grown in ISP-2 agar at 37 °C for 120 h. The antimicrobial activity tests were performed on agar block, measuring 8 x 8 mm of diameter against gram-positive, Gram-negative bacteria and yeast. For these microorganisms, suspensions were prepared with a density of 0.5 McFarland Scale, which were seeded in plates containing Mueller Hinton agar for bacteria and Sabouraud agar for yeast. The agar blocks were placed on the seeded plates, which were incubated at 37 °C for 24 h for bacteria and at 30 °C for 48 h for yeast. The assay was performed in triplicate. After the cultivation, the diameter of the halos was measured and the results were obtained by the arithmetic mean of triplicates. *Streptomyces* sp G-27 showed activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans*. It was observed that the tested actinobacteria has antimicrobial activity against five of the six microorganisms test used, revealing perspectives on the biotechnological potential of the microorganism, which was isolated from Caatinga a region with microbiota bit explored.

Keywords: *Streptomyces* sp; Secondary metabolites; Antimicrobial activity.

Introdução

Actinobactérias são bactérias gram-positivas que constituem um dos maiores filos bacterianos. São seres ubíquos, sendo encontrados em ambientes aquáticos e terrestres. Apresentam organização micelial, possuem um extenso metabolismo secundário e produzem cerca de dois terços de todos os antimicrobianos derivados da natureza, além de substâncias com ações antitumorais, anti-helmínticas e antifúngicas. Assim, essas bactérias possuem grande importância para a biotecnologia, medicina e agricultura. Além disso, algumas espécies vivem em

associação com vários organismos superiores, para os quais desempenham importantes papéis. Este filo inclui diversas espécies que, por sua vez, adotaram diferentes estilos de vida: patógenos (*Corynebacterium* spp, *Mycobacterium* spp, *Nocardia* spp, *Propionibacterium* spp e *Tropheryma* spp), habitantes do solo (*Micromonospora* spp e *Streptomyces* spp), comensais vegetais (*Frankia* spp) e comensais gastrointestinais (*Bifidobacterium* spp) (Barka et al., 2016).

Estas bactérias são conhecidas por produzir vários tipos de antibióticos, os quais possuem aplicações industriais, na agricultura, medicina e veterinária, como

- 0000-0002-0841-4051
Isllan D'Eric Gonçalves da Silva
- 0000-0001-6706-5667
Glêzia Renata da Silva-Lacerda
- 0000-0001-8878-4820
Janete Magali de Araújo
- 0000-0002-1941-8912
Gláucia Manoella de Souza Lima

estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina, novobiocina, vancomicina, nistatina e anfotericina B (Silva-Lacerda et al., 2016). Neste contexto, Barka et al. (2016) acrescentam que o gênero *Streptomyces* é extremamente valioso do ponto de vista biotecnológico, pois engloba produtores de enzimas de aplicação industrial e antibióticos comerciais, como a estreptomicina. Além disso, é o gênero mais conhecido dentre as actinobactérias, incluindo mais de 3.000 espécies identificadas.

O marco da quimioterapia microbiana ocorreu com o descobrimento da penicilina, substância produzida por um fungo do gênero *Penicillium*, cuja capacidade de inibir o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* foi descoberta acidentalmente por Alexander Fleming, no ano de 1928. Porém, seu emprego em larga escala só teve início na década de 1940. O grande impacto do uso penicilina motivou sua produção industrial, sendo este o primeiro medicamento produzido em grande escala. Assim, iniciou-se a exploração dos microrganismos como fonte de substâncias biologicamente ativas, principalmente na busca de novas substâncias com atividade antibiótica (Takahashi e Lucas, 2008).

Porém, em virtude de fatores diversos, dentre eles o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, observou-se o surgimento do fenômeno de resistência dos microrganismos a tais substâncias. A resistência microbiana é um dos obstáculos mais significativos para a saúde pública e está ameaçando desfazer décadas de avanços em sua capacidade para tratar a doença através dos produtos naturais. Os efeitos colaterais e de resistência que os microrganismos patogênicos construíram contra os antibióticos provocam falha no tratamento principal. Uma maneira de combater o problema da resistência microbiana é o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos naturais para substituição dos ineficazes (Senthil-Rajan et al., 2013).

Desta forma, estudos utilizando microrganismos oriundos do meio ambiente como produtores de metabólitos secundários são cada vez mais comuns.

Sendo a Caatinga um bioma singular devido à grande variedade de paisagens, relativa riqueza biológica e endemismo (Silva-Lacerda et al., 2016), torna-se interessante explorar tal região como fonte de substâncias de interesse biotecnológico. Marschner et al. (2004) afirmam que os solos têm comunidades microbianas distintas devido a diversos fatores, os quais incluem características físico-químicas do solo (nutrientes, teor de matéria orgânica e pH, dentre outros) e fatores ambientais (como clima e vegetação), o que pode estimular a produção de diferentes metabólitos secundários pelos microrganismos. Esta produção ocorre em resposta às adaptações para uma função específica na natureza.

Assim, considerando o aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos existentes no mercado, observa-se uma necessidade de encontrar outros agentes com potencial atividade antimicrobiana. Neste contexto, a realização de pesquisas buscando novos agentes aparece como uma alternativa para este fim. Portanto, sabendo que o bioma da Caatinga possui uma microbiota variada por apresentar características únicas, torna-se interessante estudar a diversidade microbiológica desse ambiente e, conseqüentemente, seu potencial biotecnológico.

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial antimicrobiano da cepa *Streptomyces* sp G-27 frente a microrganismos de interesse clínico.

Metodologia

Microrganismo

A actinobactéria *Streptomyces* sp G-27 foi previamente isolada de uma amostra de solo oriundo da Região Semiárida da Caatinga, mais especificamente da rizosfera da planta catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) (Corrêa et al., 2014).

Streptomyces sp G-27 encontra-se armazenado em óleo mineral, na Coleção de Microrganismos UFPEDA, do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco.

Reativação

O microrganismo foi reativado em meio ISP-2 líquido, a 160 rpm, a 37 °C, durante 5 dias. Após esse período, uma alíquota deste meio foi retirada com o auxílio de uma alça estéril e semeada em meio ISP-2, procedendo-se a incubação por cinco dias, a 37°C.

Determinação da atividade antimicrobiana

Ensaio primário. Para avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados, foi realizada uma seleção primária seguindo a metodologia proposta por Ichikawa et al. (1971), conhecida como “Método do Bloco de Gelose” ou “Teste de difusão em Ágar”. Neste processo, o composto bioativo difunde-se no ágar.

Inicialmente, elaborou-se uma suspensão de esporos de *Streptomyces* sp G-27 em solução salina a 0,9% estéril. Esta suspensão foi submetida à agitação em vórtex e 0,1 mL foi espalhada com o auxílio

de uma alça de Drigalsky em placa de Petri contendo o meio ISP-2. A placa foi incubada por cinco dias, a 37 °C, a fim de se obter um crescimento em forma de tapete.

Decorrido este tempo, verificando o crescimento satisfatório, foram retirados blocos circulares medindo 8 mm de diâmetro, utilizando um perfurador de colônias previamente esterilizado. Estes blocos foram colocados sob os microrganismos testes anteriormente plaqueados, os quais são relatados no tópico a seguir.

Microrganismos teste. Para os testes de atividade antimicrobiana, foram utilizadas duas bactérias gram-positivas, três gram-negativas e uma levedura. Estes microrganismos foram cedidos pela Coleção de Microrganismos-UFPEDA, do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco, e são descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Microrganismos utilizados na investigação do potencial antimicrobiano de *Streptomyces* sp G-27.

Microrganismos-teste	
Bactérias gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA-02) <i>Enterococcus faecium</i> (UFPEDA-138)
Bactérias gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA-224) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA-396) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (UFPEDA-416)
Levedura	<i>Candida albicans</i> (UFPEDA-1007)

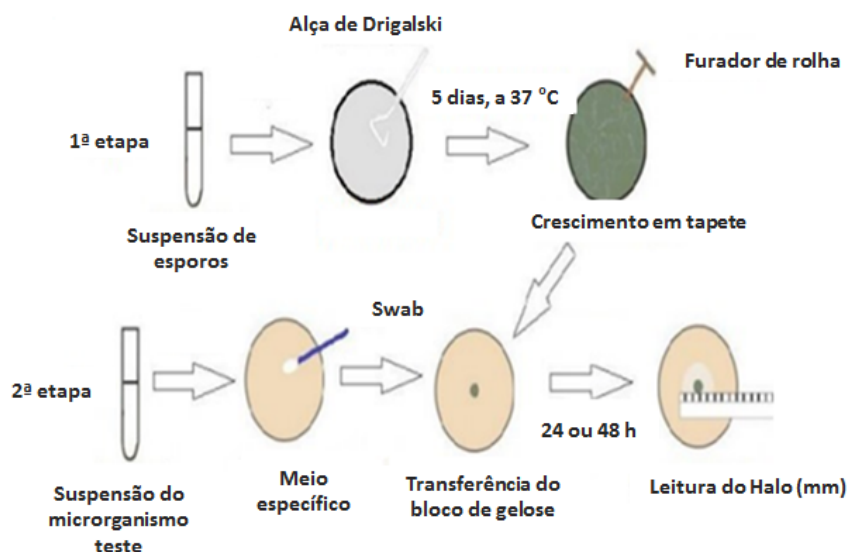


Figura 1. Esquema da realização do método “bloco de gelose”. (Fonte: Adaptado de Bernardo, 2012).

Para a atividade antimicrobiana, foram preparadas suspensões das bactérias e da levedura com densidade de 0,5 da Escala de McFarland. As suspensões foram semeadas em placas contendo Ágar Mueller Hinton para bactérias e Ágar Sabouraud para a levedura. O teste foi realizado em triplicata.

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias e a 30 °C por 24-48 h para a levedura. Após o período de cultivo, o diâmetro dos halos foi medido e os resultados foram obtidos pela média aritmética das triplicatas. A metodologia

para realização dos testes aqui descritos encontra-se esquematizada na Figura 1.

Resultados e discussão

O microrganismo *Streptomyces* sp G-27 apresentou atividade antimicrobiana contra cinco dos seis microrganismos testados, conforme descrito na Tabela 2. Como é possível observar, os maiores halos de inibição foram formados contra *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus*. Nas condições testadas, não houve inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 2. Média aritmética dos halos de inibição (mm) de *Streptomyces* sp G-27 frente a microrganismos de interesse clínico.

Microorganismo-teste	Halos (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	29,5
<i>Enterococcus faecium</i>	31,0
<i>Escherichia coli</i>	14,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10,0
<i>Candida albicans</i>	16,0

(-): não houve halo de inibição

O ensaio de bloco de gelose é um método físico no qual um microrganismo teste é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância testada.

Este ensaio permitiu então, que o metabólito secundário produzido pela actinobactéria *Streptomyces* sp G-27 se difundisse no meio de cultura, impedindo o crescimento da grande maioria dos microrganismos-teste, mostrando, assim, ser uma metodologia satisfatória para este fim.

De acordo com Mendes (2010), actinobactérias são abundantemente conhecidas devido ao seu potencial na produção de moléculas bioativas, consequência de seu metabolismo secundário, o que pode justificar os resultados obtidos neste trabalho.

Zhao et al. (2009) também executaram um teste de difusão em ágar de actinobactérias isoladas de sedimentos marinhos, constatando que algumas cepas investigadas demonstraram vasto espectro ação: alguns isolados apresentaram atividade fungicida, à medida que outros apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, com halos de até 22 mm, 30 mm, 25 mm e 26 mm, respectivamente. Assim, os resultados obtidos por Zhao et al. (2009) estão em concordância com os resultados do presente trabalho.

Ao analisar o tamanho dos halos de inibição apresentados na Tabela 2, pode-se notar que a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (*Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus*) foi maior do que para as gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e para a levedura (*Candida albicans*). Segundo Madigan (2010), o menor percentual de

atividade antimicrobiana frente a gram-negativos é consequente da natureza complexa de sua parede celular, a qual possui uma membrana externa ao seu redor, o que confere maior resistência à ação de antibióticos, os quais não são capazes de transpassar tal barreira lipídica.

O aumento do número de casos de resistência a antibióticos por microrganismos da prática clínica multirresistentes e a falta de opções terapêuticas a curto e médio prazo para tratamento das infecções causadas por essas por eles reforçam necessidade de se encontrar novas alternativas terapêuticas para tratar infecções. De acordo com Boucher et al. (2009), microrganismos como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. são as bactérias mais prevalentes causadoras da maioria das infecções hospitalares nos EUA e efetivamente escapam da ação dos antibacterianos.

As doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade no mundo. O número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) sofreu um decréscimo. Assim, a busca por novos agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes dos fármacos em uso precisou ser intensificada. A resistência microbiana, especialmente em ambientes hospitalares, encontra-se com taxas elevadas e, com isso, surgiu uma necessidade imediata pela busca de novos antibióticos (Guimarães et al., 2010). Desta forma, este estudo qualitativo realizado com diversos microrganismos de interesse clínico pode ser considerado promissor, pois indica que *Streptomyces* sp G-27 é produtor de um agente antimicrobiano, o qual precisa ser e identificado em estudos subsequentes.

Os resultados obtidos confirmam que as bactérias do gênero *Streptomyces* sp são capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos. Assim, actinobactérias aparecem como uma fonte útil e poderosa para a produção de metabólitos de interesse biotecnológico, especialmente para a obtenção de novos antibióticos.

Conclusão

A pesquisa por novos antibióticos continua objetivando combater bactérias e fungos resistentes, melhorar as propriedades farmacológicas, combater tumores e parasitas. Desta forma, os halos de inibição do crescimento dos microrganismos de interesse clínico demonstraram que a actinobactéria *Streptomyces* sp G-27 aparece como possível fonte de compostos naturais bioativos, apresentando-se como uma bactéria de considerável potencial biotecnológico. Ademais, este trabalho enaltece as pesquisas realizadas com microrganismos isolados de regiões cuja microbiota ainda é pouco explorada, a Caatinga. Outros estudos estão em andamento visando aprimorar as condições de produção do metabólito secundário, bem como para extrair e purificá-lo.

Declaração de conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Referências

- Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H. P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; Wezel, G. P. V. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Bernardo, G. R. B. **Atividade antifúngica de actinobactérias da rizosfera de *Terminalia fagifolia* (Bioma Caatinga) ativas contra *Candida* spp.** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2012. (Trabalho de Conclusão de Curso).
- Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009. <http://dx.doi.org/10.1086/595011>
- Corrêa, G. G. **Potencial biotecnológico de actinobactérias da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do Bioma Caatinga.** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2014. (Dissertação de Mestrado).

- Guimarães, D. O.; Momesso, L. S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>
- Ichikawa, T.; Ishikura, T.; Ozaki, A. A improvement of kasugamycin: producing strain by the agar piece method and prototroph method. **Folia Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 218-224, 1971.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V.; Clark, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- Marschner, P.; Crowley, D.; Yang, C. H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant Soil**, v. 261, n. 1/2, p. 199-208, 2004. <http://dx.doi.org/10.1023/B:PLSO.0000035569.80747.c5>
- Mendes, T. D. **Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Atinni (Hymenoptera: Formicidae)**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2010. (Dissertação de Mestrado).
- Senthil-Rajan, D.; Rajkumar, M.; Srinivasan, R.; Kumarappan, C.; Arunkumar, K.; Senthilkumar, K. L.; Srikanth, M. V. Investigation on antimicrobial activity of root extracts of *Thespesia populnea* Linn. **Trop. Biomed.**, v. 30, n. 4, p. 570-578, 2013. Disponível em: <http://www.msptm.org/files/570_-_578_Dharmalingam_SR.pdf>. Acesso em: 01 de abril de 2016.
- Silva-Lacerda, G. R.; Santana, R. C. F.; Vicalvi-Costa, M. C. V.; Solidônio, E. G.; Sena, K. X. F. R.; Lima, G. M. S.; Araújo, J. M. Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga Biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Genet. Mol. Res.**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2016. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017488>
- Takahashi, J. A.; Lucas, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Quím. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700036>
- Zhao, X. Q.; Jiao, W. C.; Jiang, B.; Yuan, W. J.; Yang, T. H.; Hao, S. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides. **World J. Microb. Biot.**, v. 25, n. 5, p. 859-866, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-9964-y>