

Artigo original

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PRODUZIDA POR ESTREPTOMICETOS ISOLADOS DE SOLOS PARAIBANOS

Thompson Lopes de Oliveira¹
Ivone Antonia de Souza²
Edeltrudes de Oliveira Lima³
Catiana de Oliveira Lima⁴

RESUMO

Com o aumento significativo das infecções bacterianas resistentes e multiresistentes durante as últimas décadas, há a necessidade de pesquisa de novas drogas antibacterianas com qualidade superior às existentes. Dessa forma, o estudo dos *Streptomyces* do solo como fonte de produtos bioativos tem revelado inúmeras substâncias antimicrobianas de diferentes classes e mecanismos ações. Esta pesquisa objetivou o isolamento de estreptomicetos produtores de metabólitos bioativos com efeito antibacteriano. Foram coletadas 68 amostras de solo em mesorregiões da Paraíba, com o isolamento de 49 espécies de estreptomicetos. As cepas de *Streptomyces* foram identificadas através de análises macromorfológicas das colônias semeadas em meio Kuster Williams, e análises micromorfológicas por meio de microcultivos observados em microscópio de campo claro. Os testes de antagonismo seguiram o método de difusão em meio sólido com blocos de ágar frente às espécies de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus epidermidis*, oriundas de coleção ATCC - (American Type Culture Collection) e de origem clínica. Os halos de inibição variaram de 10 a 20 mm de diâmetro, eminentes para as cepas de bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 e *Staphylococcus epidermidis* SSL-1. Os resultados demonstram o potencial antibiótico dos estreptomicetos existentes no solo paraibano, fecundo para elucidação de novas drogas a serem utilizadas na clínica humana e veterinária.

INTRODUÇÃO

Poucos ambientes na terra fornecem tão grande variedade de microrganismos como o solo fértil. Os microrganismos formam uma coleção microscópica, que pode alcançar um total de bilhões de organismos por grama de solo, sendo a maior proporção nas primeiras camadas de centímetro do solo, diminuindo à medida que se aprofunda (PELCZAR *et al.*, 2000).

A biotecnologia em parceria com a saúde humana e veterinária vem apresentando um expressivo destaque em escala mundial na elucidação e produção de medicamentos

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPE.
E-mail: thompson_oliveira@yahoo.com.br

²Doutora em Toxicologia. Professora do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. E-mail: ias@ufpe.br

³Doutora em Micologia. Professora do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba - UFPB. E-mail: edeolima@yahoo.com.br

⁴Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba-UFPB.

oriundos de plantas e microrganismos. Esse crescimento é estimado em cifras na ordem de 30 bilhões anuais, apresentando uma taxa aproximadamente de 15% anual, frente apenas a 4% dos medicamentos de origem sintética (CALIXTO, 2000; RODRIGUES, 2004).

Dessa forma, a busca por ambientes *in natura*, potencialmente ricos em substâncias bioativas e elementos diversos, direciona ao estudo das populações pre-sentes no solo pelo fato deste comportar-se como um forte representante ambiental com característica rica e complexa, fecundo para o isolamento de substâncias biologicamente ativas (RANGASWAMI e OBLISAMI, 1967).

O solo fértil é formado por um nicho ecológico microscópico composto por milhares de bactérias, fungos, algas e protozoários, potencialmente produtores de substâncias de interesse clínico e agroindustrial, em destaque os mais diversos antibióticos e praguicidas (BLACK, 2002; MURRAY, 2005).

Dentre os microrganismos do solo com um papel econômico e industrial, os *Streptomyces* se apresentam versáteis em produzir metabólitos primários e secundários, cujas aplicações biotecnológicas se enquadram nas mais diversas áreas (VINING, 1979). Entre esses metabólitos, destacam-se as mais diversas substâncias antibióticas pertencentes a diferentes classes com mecanismos distintos de ação (OMURA *et al.*, 1999).

A estrutura, fisiologia e ecologia dos *Streptomyces* spp foram caracterizadas e com isso várias rotas de síntese de produtos bioativos descobertas, as quais apresentaram uma larga aplicação em diferentes áreas, desde a clínica humana à agricultura (SASAKI, 2001; THOME e ALDER, 2002).

As substâncias elaboradas pelos *Streptomyces* spp são distribuídas em classes diferenciais como enzimas, agentes antitumorais, imunomoduladores, antiparasíticos, antihelmínticos, antiprotozoários, antivirais, antimicrobianos, além de herbicidas e inseticidas de ampla aplicação (SANGLIER *et al.*, 1993)

As substâncias produzidas por *Streptomyces* spp exibem grande diversidade química, contudo, novas estruturas

também têm sido isoladas de outros gêneros representantes de solo fértil, principalmente *Actinomadura*, *Actinoplanes* e *Micromonospora* difundindo as opções em estudo de microrganismos de solo (LAZZARINI *et al.*, 2002).

Todavia, os produtos de origem natural têm desempenhado relevante papel na descoberta de novos fármacos, sendo necessário um estudo detalhado para se conseguir novos produtos bioativos a serem aplicados como ferramenta na saúde pública (DAMAIN, 1995).

OBJETIVOS

Os objetivos desta pesquisa, foram:

- isolar e identificar estreptomicetos de mesoregiões da Paraíba;
- avaliar a produção de metabólitos bioativos pelos *Streptomyces* sp. através de ensaios de antagonismos;
- realizar o *screening* frente a espécimes de origem clínica e de coleção.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta partiu de aproximadamente 300g do solo isoladamente nas mesoregiões da Paraíba-Brasil. As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis e enviadas ao laboratório para processamento, segundo Garcia-Quintana (1997). Em seguida, suspendeu-se 1g da amostra em 9 mL de solução salina estéril em tubo de ensaio até a 10⁷ diluição. Homogeneizaram-se as amostras em vortex, deixando-as em repouso por 15 minutos. Posteriormente, foram inoculadas alíquotas de 0,1mL em meio de cultura Kuster Williams, incubando-se a temperatura ambiente por 7 dias a 26° C.

Após crescimento colonial, os estreptomicetos foram caracterizados através de avaliação macromorfológica e técnica de microcultivo. Para a realização do *screening* foram selecionadas cepas bacterianas ATCC - American Type Culture

Colletion e de origem clínica mantidas em estoque em meio Muller Hinton, fornecido pela Difco.

Em seguida foram feitas suspensões dos estreptomicetos em estudo, colocado 1,0 mL em placa de Petri estéril e vertido o meio Kuster Williams para a preparação dos blocos de Agar. Na etapa seguinte foram preparadas suspensões dos mi-croorganismos testes inoculadas em pour-plate e pós-solidificação realizado a distri-buição dos blocos de agar com os *Streptomyces*. As placas foram incubadas por 24-48 horas em estufa bacteriológica. Após período de incubação, foram reali-zadas leituras utilizando-se um paquí-metro, comparando os dados com a da lite-ratura. Como drogas padrões, foram utili-zadas a oxacilina - 1mcg e a gentamicina - 10 mcg.

O estudo foi realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba-Brasil.

Observa-se uma predominância dos estreptomicetos na região da Mata Paraibana, em um quantitativo de 19 amostras isoladas. Essa prevalência decorre em

RESULTADOS

Tabela 1. Quantificação dos Estreptomicetos Isolados de Mesorregiões da Paraíba

MESORREGIÕES	Streptomyces spp
Mata Paraibana	19
Sertão	09
Borborema	08
Agreste Paraibano	13
Total	49

princípio pelo tipo de solo, com característica arenosa e teor de umidade presente. Esses dados assemelham-se com outros encontrados por Ujikawa (2003).

Na mesorregião do Agreste Paraibano foram isoladas 13 amostras de estreptomicetos, seguido da região do Sertão, com 09 espécies, e da Borborema, com 08 espécimes de estreptomicetos isolados e identificados.

A Figura 1 representa as cores observadas na macromorfologia dos estreptomicetos cultivados em meio de cultura Kuster Williams. Observa-se uma maior predominância da cor branca entre os isolados do solo em um percentual de 57%, seguida das cores cinza com 26%, café com 13% e amarela com 4%.

Esse padrão de coloração do micélio aéreo está condizente com espécimes isolados em diferentes tipos de solos do Brasil e do mundo, com uma prevalência da cor branca nas colônias de estreptomicetos isoladas, informação esta observada por Singh e Agrawal (2001).

Na Figura 2, observa-se o efeito antagônico dos estreptomicetos isolados de diferentes solos frente à cepa de *Staphylococcus epidermidis* SSL-1. Esse

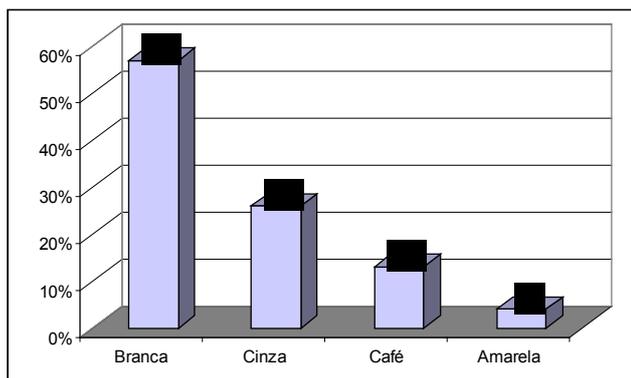


Figura 1. Cores da macromorfologia dos estreptomicetos isolados do solo paraibano.

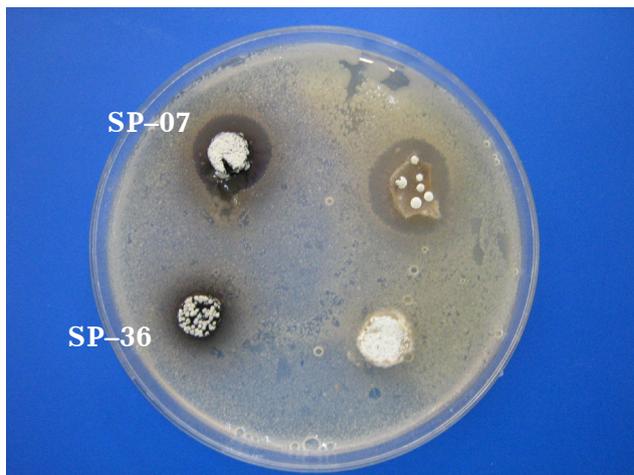
agente, apesar de ser constituinte de microbiota residente humana, tem a capacidade de desenvolver patologias de interesse médico, bem como em estabelecer a formação de biofilmes em cateteres e dispositivos, funcionando como fonte fecunda para a indução de processos infecciosos (PELCZAR, 2000).

Observa-se, na figura 2, o resultado do ensaio de antagonismo, onde o *Streptomyces* SP-36 apresentou um halo de inibição de 11 mm, seguido do estrepto-miceto SP-07 com a formação de um halo de inibição superior de 15 mm. Esses dados comprovam a capacidade inibitória das cepas de *Streptomyces* isoladas do solo paraibano produzindo metabólitos secundários e corroboram com outros achados de literatura, conforme Garcia-Quintana (1997), Ujikawa (2003) e Yanittza (2005). Os halos observados nos ensaios se apresentam semelhantes e até superiores aos encontrados em testes de susceptibilidade

padronizados, utilizando-se drogas antimicrobianas como a oxacilina - 1mcg, eficaz *in vitro* para contra o *S. epidermidis*, a partir da formação de halo de 13 mm.

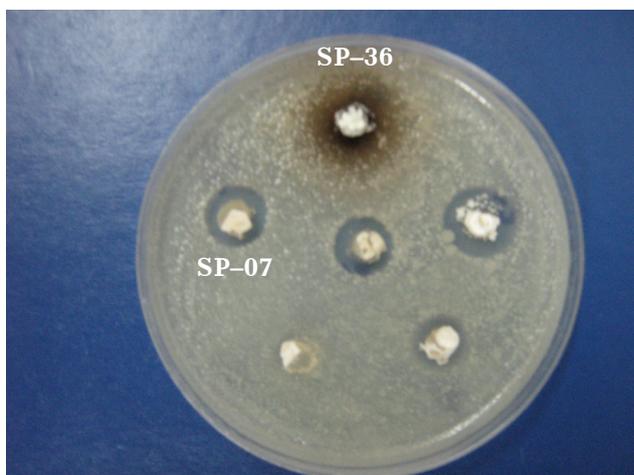
Na Figura 3, observa-se o efeito antagonístico dos estreptomicetos isolados de diferentes solos frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC-6538. Esse microrganismo se apresenta como emergente entre os processo de infecção comunitária e de origem hospitalar, apresentando o agravamento em adquirir muito rapidamente um perfil de resistência e até multi-resistência a drogas antimicrobianas usuais (MURRAY, 2005).

Para a espécie de *Streptomyces* SP-36, o halo de inibição foi de 13 mm, já a espécie de estreptomiceto SP-07 apresentou um halo de inibição superior a 14 mm. Esses dados revelam o poder inibitório das cepas de *Streptomyces* isoladas do solo paraibano, e corroboram com outros achados discutidos em literatura conforme Ujikawa (2003) e Yanittza (2005). Os halos



Staphylococcus epidermidis SSL-1

Figura 2. Antagonismo entre amostras de *Streptomyces* spp em bloco de agar frente à cepa de *Staphylococcus epidermidis* SSL-1.



Staphylococcus aureus ATCC - 6538

Figura 3. Antagonismo entre amostras de *Streptomyces* spp em bloco de agar frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC-6538.

observados nos ensaios se apresentam semelhantes aos encontrados em testes de susceptibilidade padronizados, utilizando-se drogas antimicrobianas como a oxacilina - 1mcg, eficaz *in vitro* para contra o *S. aureus*, a partir da formação de halo de 13 mm.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isolados 49 estreptomicetos a partir de 68 coletas realizadas em solo paraibano.

Das quatro mesorregiões estudadas, a Mata Paraibana revelou ser a mais fecunda para a obtenção desses microrganismos produtores de efeitos antagônicos sobre espécies de coleção e de origem hospitalar.

Dos 49 espécimes isolados de estreptomicetos, as espécies *Streptomyces* SP-36 e *Streptomyces* SP-07 apresentaram relevante efeito antagônico frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC-6538, bem como sobre o *Staphylococcus* coagulase-negativo SSL-1.

A inibição promovida pelas cepas de estreptomicetos SP-36 e SP-07, observada

no ensaio *in vitro* frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC-6538, com halos respectivos de 13 mm e 14 mm, creditam valores próximos e até superiores às drogas antimicrobianas usuais na clínica humana e veterinária, como a oxacilina 1mcg eficaz contra o *S. aureus*, a partir da formação de halo de 13 mm.

Os halos de inibição superiores a 10 mm observados entre as cepas de estreptomicetos SP-36 e SP-07, contra o *Staphylococcus epidermidis*, fomentam novas pesquisas com esses microrganismos, na possibilidade de encontrar uma nova substância antimicrobiana eficaz contra as espécies do gênero *Staphylococcus* spp.

Os diferentes tipos de solo paraibano se mostraram fecundos para o isolamento de espécies de *Streptomyces*, potencialmente produtoras de metabólitos bioativos, com características antimicrobianas.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY PRODUCED BY STREPTOMYCETES ISOLATED OF THE PARAIBANOS SOILS

ABSTRACT

With the significant increase in bacterial infections resistant and multiresistant during the last decades, there is an urgent need to screen for new antibacterial drugs possessing some advantages over known ones. Thus, the study of *Streptomyces* ground as a source of products bioactive has revealed innumerable antimicrobial substances of different classes and mechanisms of action. This article reports the isolation of streptomyces producers of bioactive metabolites with antibacterial effect. They were collected 68 samples from ground paraibano. Through macromorphology analyses of colonies sown in the Kuster Williams medium and micromorphology analyses through microcultivations and observed through light microscope. The tests of antimicrobial followed the method of diffusion in solid medium with agar block, facing the specimens of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus epidermidis* from collection ATCC - (American Type Culture Colletion) and the original clinic. The inhibition halos varied from 10 to 20 mm diameter, more eminent for the strains of Gram-positive bacteria such the *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 and *Staphylococcus epidermidis* SSL1. The results demonstrate the potential antibiotic of streptomyces existing in the ground paraibano, fecundity for the elucidation of new drugs to be used in human and veterinary clinic.

Keywords: *Streptomyces*. Ground. Antibiotic.

REFERÊNCIAS

- BLACK, G. J. *Microbiologia: fundamentos e perspectivas*, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 22, p. 460.
- ALIXE, J. B. *Revista Brasileira de Ciências Exatas*, v. 29, n. 167, p. 11-15, 2000.

- DAMAIN, A. L. Why do microorganisms produce antimicrobials? In: HUNTER, P. A.; DARBY, G. K.; RUSSELL, N. J. (Eds.). **Fifty Years of Antimicrobials: past, prospective and future trends**. Cambridge: University Press, 1995, p. 205-228.
- GARCIA-QUITANA, H.; ZAROR, C.; LEIVA, P.S. Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* spp aisladas de suelos chilenos. **Rev. Méd. Chile.**, v. 125, p. 1157 - 1164, 1997.
- LAZZARINI, A.; CAVALETTI, L.; TOPPO, G.; MARINELLI, F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 399-405, 2002.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- OMURA, S. *et al.* Isolation and structure of a new antibiotic vridomycin F produced by *Streptomyces* sp. K96-0188. **The Journal of Antibiotics**. V. 52, n. 1, p. 61-64, 1999.
- PELCZAR JR., J. M. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 3. ed. São Paulo: Makron Books, 2000, vol. 3.
- RANGASWAMI, G.; OBLISAMI, G. A study of the correlation between the antagonistic actinomycetes and the physical and chemical properties of some soils of south India. **India Phytopathology**, v. 20, p. 280 - 290, 1967.
- RODRIGUES, G. Fitomedicamentos têm notável expansão mercadológica. **Jornal Phytociência**. v. 1, p.1-2, 2004.
- SANGLIER, J. J.; HAAG, H.; HUCK, T.A.; FEHR, T. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). **Research in Microbiology**, v. 144, p. 633-642, 1993.
- SASAKI, T.; *et al.* TPU-0031-A and B, new antibiotics of the novobiocin group produce by *Streptomyces* sp. TP-A0556. **The Journal of Antibiotics**. v. 54, n. 5, p. 441-447, 2001.
- SINGH, D.; AGRAWAL, V.P. **Biodiversity of actinomycetes of Lobouche in Mount Everest I**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinost/Taxonomy>>. Acesso em: 10 ago. 2006.
- THOME, G.M.; ALDER, J. Daptomycin: a novel lipopeptide antibiotic. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 24, n. 5, p. 33-40, 2002.
- UJIKAWA, K.; VILEGAS, W. Antibióticos antifúngicos produzidos actinomicetos no Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. **Rev. Brasileira Ciências Farmacêuticas**. V. 39, n. 02, 2003.
- VINING, L.C. Secondary metabolism. In: REHM, H.J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. v. 4, p. 21-29, 1979.
- YANITTZA, Y.M. M. Atividade antifúngica de *Streptomyces* sobre células leveduriformes. **Rev. Med. Chile**. V. 7, n. 46, 2005.