

Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* sp. UFPEDA 968

Isolation, Identification And Antimicrobial Activity Of *Streptomyces* sp. UFPEDA 968

E. C. L. Soares¹; E. P. Costa²; L. C. N. Silva³; J. M. Araújo⁴

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-PE, Brasil

²Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-PE, Brasil

³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-PE, Brasil

⁴Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-PE, Brasil

erikinhlima@gmail.com

(Recebido em 17 de novembro de 2012; aceito em 27 de dezembro de 2012)

Os micro-organismos endofíticos são conhecidos pela sua relação simbiótica com os vegetais, de quem recebem alimento, enquanto promovem sua proteção através da produção de metabólitos. A pesquisa destes compostos biologicamente ativos para fins terapêuticos em plantas utilizadas pela medicina popular e em micro-organismos endofíticos tem enriquecido a busca e a descoberta de novos fármacos com potenciais anti-inflamatório, antimicrobiano e antitumoral, entre outros. Das folhas da planta medicinal *Eugenia uniflora* L. (pitanga), uma actinobactéria foi isolada, a qual foi identificada através da técnica de microcultivo, como *Streptomyces* sp.UFPEDA 968. Nos testes iniciais, foi verificada sua atividade antibacteriana com destaque para *Escherichia coli* e *Mycobacterium tuberculosis* (média dos halos = 20mm); e antifúngica, com destaque para *Aspergillus niger* (média dos halos = 30mm). A seguir, a actinobactéria foi testada frente a cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), algumas com perfil de multirresistência, apresentando média de halos em torno de 40mm. O objetivo do presente estudo foi o isolamento, identificação e avaliação da atividade antimicrobiana dos endofíticos de *Eugenia uniflora* L.

Palavras-chave: Endofíticos; *Eugenia uniflora* L.; *Streptomyces*

The endophytic microorganisms are known for their symbiotic relationship with plants, from whom they receive food, while promoting its protection through the production of metabolites. The study of these biologically active compounds for therapeutic plants used in folk medicine and by microorganisms endophytic has enriched the search and discovery of new drugs with potential anti-inflammatory, antimicrobial and antitumor activities, among others. The leaves of the medicinal plant *Eugenia uniflora* L. (Surinam cherry), a actinobacteria was isolated, which was identified by microcultive technique, such as *Streptomyces* sp.UFPEDA 968. In early tests, its antibacterial activity was observed especially *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* (mean = 20mm halos), and antifungal, especially *Aspergillus niger* (average of halos = 30mm). Then the actinobacteria was tested against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from the Hospital of the Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), some with multidrug resistance profile, with an average of halos around 40mm. The aim of this study was the isolation, identification and antimicrobial activity of endophytic *Eugenia uniflora* L.

Keywords: Endophytic; *Eugenia uniflora* L.; *Streptomyces*

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade está diretamente relacionada à diversidade química, uma vez que os organismos estão sujeitos a constantes interações metabólicas e ambientais que podem originar novos metabólitos secundários de grande importância para a indústria farmacêutica. O homem sempre procurou conhecer as plantas e suas propriedades medicinais, pois o aumento da produtividade agrícola e das enfermidades tem levado a investigação e descoberta de substâncias úteis na cura das doenças e na síntese de agroquímicos [1]. O interesse pela utilização de medicamentos fitoterápicos surgiu pela crença popular de que essas substâncias

são isentas ou apresentam poucos efeitos colaterais, além da sua aparente eficácia quando a medicina tradicional não alcança os resultados esperados.

Micro-organismos endofíticos são aqueles que colonizam o interior dos tecidos de plantas terrestres e aquáticas, não causando, aparentemente, sintomas de doenças [2]. Todas as plantas apresentam em seu interior micro-organismos, até mesmo diversas espécies em um único hospedeiro [3]. A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pertence à família *Myrtaceae* que compreende cerca de 80 gêneros, com aproximadamente 3000 espécies, amplamente distribuídas nas florestas brasileiras, regiões tropicais e subtropicais do planeta [4,5]. O uso medicinal de muitas de suas espécies tem sido comprovado por apresentar atividade antimicrobiana, antiviral, hipoglicemiante, antioxidante e anticancerígena [6,7].

Dentre as substâncias bioativas produzidas pelos micro-organismos endofíticos, os antimicrobianos apresentam grande relevância e interesse científico. Há vários relatos na literatura correlacionando o conhecimento fitoterápico e o isolamento de endófitos, possibilitando a descoberta de novas substâncias que possam conter, pelo menos por um período de tempo, o avanço da multirresistência dos micro-organismos patogênicos [4]. Entre os micro-organismos produtores de antimicrobianos, merece destaque o gênero *Streptomyces*, como um dos principais produtores de metabólitos bioativos diversos, como antibióticos, herbicidas, pesticidas, antiparasíticos, além de várias enzimas [8]. Os produtos naturais podem ser mais uma fonte econômica de diversidade química além da síntese de inúmeros produtos químicos diversos. Estima-se que há 250 mil espécies de plantas no mundo e provavelmente, 10% destas foram testadas para algum tipo de atividade biológica. Portanto, o uso de produtos naturais tem sido a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novos medicamentos, estando atualmente os micro-organismos endofíticos como uma fonte promissora para a busca de novos metabólitos bioativos [9]. O presente estudo teve como principais objetivos, o isolamento, a identificação e a avaliação da atividade antimicrobiana de uma actinobactéria isolada das folhas da pitangueira.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLAMENTO: Folhas sadias de *Eugenia uniflora* L. foram conduzidas ao Laboratório de Genética de Micro-organismos, onde foi realizado o tratamento de desinfecção com hipoclorito de sódio segundo Pereira et.al. e Araújo et.al.[10,11], para eliminação de micro-organismos epifíticos e a seguir, realizados os isolamentos. Duas coletas foram realizadas, uma em período seco (setembro de 2009) e outra em período chuvoso (fevereiro de 2010), sendo utilizados dois tempos de desinfecção – 5 e 10 min [12]. Os meios Sabouraud (SAB), Batata Dextrose ágar (BDA), ISP₂ (extrato de malte) e Ágar água (AA), foram selecionados para este ensaio. A fim de verificar a eficácia da desinfecção, alíquotas da última água de lavagem foram plaqueadas em cada meio utilizado no isolamento. A actinobactéria isolada se encontra preservada na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA).

IDENTIFICAÇÃO CLÁSSICA: Para análise morfológica da actinobactéria, foi utilizada a técnica de microcultivo [13]. O micro-organismo foi cultivado nos meios ISP₂, ISP₃ e SABOURAUD ágar, com a inserção parcial de lamínulas nos meios de cultura para crescimento das hifas sobre sua superfície e incubado a 30° C por cerca de 21 dias. Após o período de incubação, foram observadas características culturais tais como coloração e pigmentação além de características micromorfológicas, através do microscópio óptico, como presença ou ausência de esporos, forma da cadeia de esporos ou a presença de esporângio.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA: Na avaliação da atividade antimicrobiana da actinobactéria, foi utilizada a técnica de bloco de gelose descrita por Ichikawa et.al.[14], utilizando os micro-organismos teste (**tabela 01**). A actinobactéria endofítica foi cultivada nos

meios Sabouraud (SAB), ISP₂, ISP₃ em forma de tapete. Blocos de 7mm foram colocados nas placas contendo o micro-organismo teste. Os testes foram realizados em triplicata.

Tabela 1: Micro-organismos utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.

ORSA – *Staphylococcus aureus* Oxacilina resistente

Micro-organismo teste	Informações		
	Número UFPEDA	Número ATCC	Origem
<i>Staphylococcus aureus</i>	02	6538	Coleção de culturas UFPEDA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	82	-	Coleção de culturas UFPEDA
<i>Bacillus subtilis</i>	86	-	Coleção de culturas UFPEDA
<i>Micrococcus luteus</i>	100	-	Coleção de culturas UFPEDA
<i>Escherichia coli</i>	224	25922	Coleção de culturas UFPEDA
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	396	-	Coleção de culturas UFPEDA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	416	27853	Coleção de culturas UFPEDA
<i>Candida albicans</i>	1007	-	Coleção de culturas UFPEDA
<i>Malassezia furfur</i>	1320	-	Coleção de culturas UFPEDA
<i>Aspergillus niger</i>	2003	-	Coleção de culturas UFPEDA
<i>Shigella flexneri</i>	41	-	Isolado clínico
<i>Salmonella enteridis</i>	414	-	Isolado de úlcera
<i>Enterococcus faecalis</i>	620	-	Isolado de hemocultura
<i>Staphylococcus aureus</i> (Coagulase negativa)	630	-	Isolado de secreção vaginal
<i>Staphylococcus aureus</i>	660	-	Isolado de ponta de cateter
<i>Staphylococcus aureus</i>	663	-	Isolado de urina
<i>Staphylococcus aureus</i>	664	-	Isolado de urina (ORSA)
<i>Staphylococcus aureus</i>	670	-	Isolado de sangue (ORSA)
<i>Staphylococcus aureus</i>	672	-	Isolado de secreção de prótese
<i>Staphylococcus aureus</i>	676	-	Isolado de secreção de ferida
<i>Staphylococcus aureus</i>	677	-	Isolado de ferida operatória
<i>Staphylococcus aureus</i>	679	-	Isolado de fragmento de tecido
<i>Staphylococcus aureus</i>	682	-	Isolado de secreção ocular
<i>Staphylococcus aureus</i>	687	-	Isolado de secreção dreno-tórax
<i>Staphylococcus aureus</i> Teste D+	697	-	Isolado de exsudato purulento
<i>Staphylococcus aureus</i>	709	-	Isolado de ferida transplante
<i>Staphylococcus aureus</i>	712	-	Isolado de escarro (ORSA)
<i>Staphylococcus aureus</i>	730	-	Isolado de escarro (ORSA)
<i>Staphylococcus aureus</i>	733	-	Isolado de fragmento ósseo (ORSA)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de desinfecção das folhas de *Eugenia uniflora* com hipoclorito de sódio [10,11], mostrou-se eficaz por não ocorrer crescimento microbiano no plaqueamento da água de lavagem. A actinobactéria em estudo foi isolada no período seco. Um ponto importante a ser observado, é que as folhas da pitanga quando submetidas à desinfecção, não apresentaram rápida oxidação, o que pode ter interferido positivamente no crescimento dos endófitos. Resultado similar foi observado por Souza et. al. [15], durante isolamento de endófitos de duas plantas tóxicas da Amazônia como *Palicourea longiflora* que apresentou também pequena quantidade de endófitos, em virtude do rápido escurecimento das folhas quando submetidas à desinfecção, enquanto as folhas *Strychnos cogens* mostraram-se mais resistentes à oxidação, resultando num aumento significativo dos endófitos isolados. Quanto ao surgimento de actinobactérias, o maior tempo de desinfecção (10 minutos) promoveu o aparecimento da actinobactéria.

As características morfológicas observadas por microscopia óptica da actinobactéria AEU 1 (ACTINO EUGENIA UNIFLORA) (**Figura 1**), mostrou esporóforos em forma de espirais longas, características do gênero *Streptomyces*, como foi proposto por Walkman & Henrici [16]. Esta morfologia e a parede celular que contém ácido L-diaminopimélico é característica da família *Streptomycetaceae*. De acordo com Lechevalier & Lechevalier [17], estas bactérias filamentosas são aeróbias e não possuem açúcar na parede celular. Estas características permitiram a identificação desta actinobactéria AEU 1 como pertencente ao gênero *Streptomyces* sp., catalogada na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos como UFPEDA 968. Estudos moleculares a serem realizados posteriormente utilizando primers para região 16S rDNA, associado a outras características bioquímicas, possibilitarão a identificação da espécie. Outros autores [6, 18, 12,19], também observaram a predominância deste gênero. A presença de endófitos do gênero *Streptomyces*, tem importante papel em relação ao desenvolvimento e a saúde da planta, pois suas atividades biológicas podem influenciar no crescimento da planta, na assimilação de nutrientes ou na produção de metabólitos secundários [6].

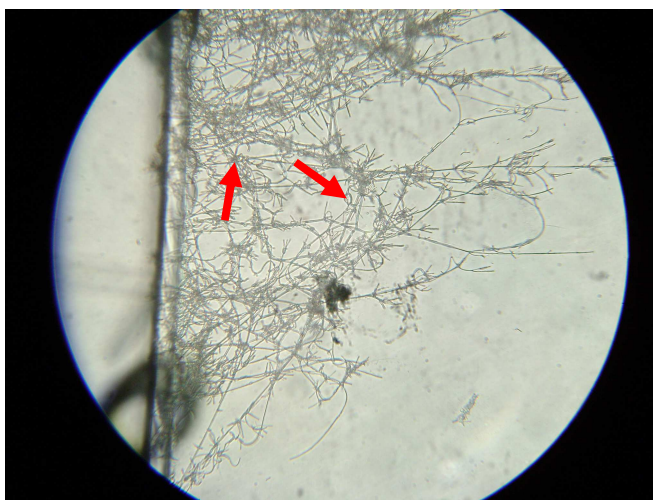


Figura 1: Microcultivo da linhagem *Streptomyces* sp. UFPEDA 968.
As setas indicam a morfologia das cadeias.

Os resultados mostram que, dos 10 micro-organismos inicialmente testados em bloco de gelose, *Streptomyces* sp. não apresentou atividade para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, enquanto halos de inibição variando de 18 a 32 mm foram observados para outros micro-organismos (**Figura 2**). No segundo ensaio em bloco de gelose da actinobactéria

Streptomyces sp., para as 16 linhagens de *S. aureus* isolados clínicos, das quais 6 linhagens apresentam perfil de multirresistência, foram observados halos de inibição variando de 37,3 mm a 42,3 mm como pode ser observado na figura 3. Estes resultados demonstram o grande potencial desta linhagem, como produtora de metabólitos bioativos com ação para *S. aureus* multirresistentes.

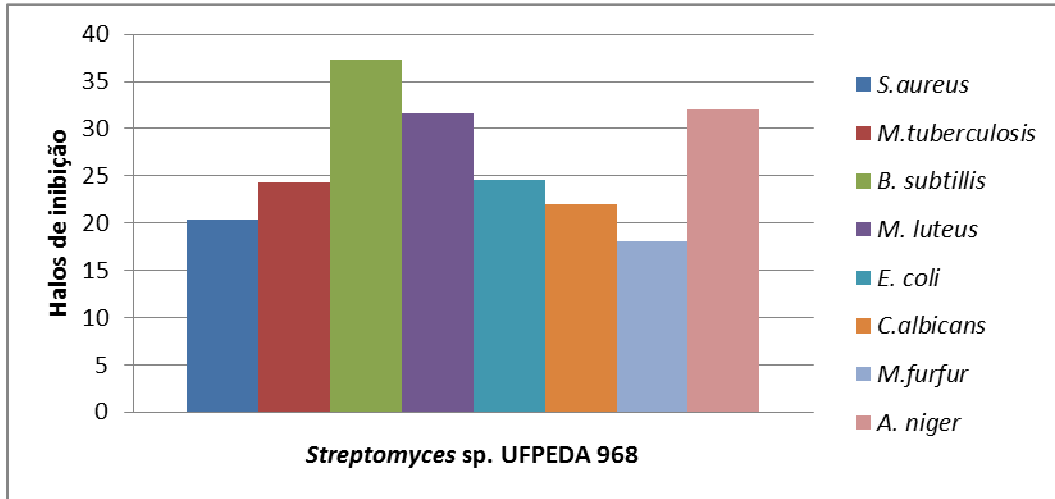


Figura 2: Atividade antimicrobiana da actinobactéria *Streptomyces* sp. UFPEDA 968, frente à diversos micro-organismos-teste.

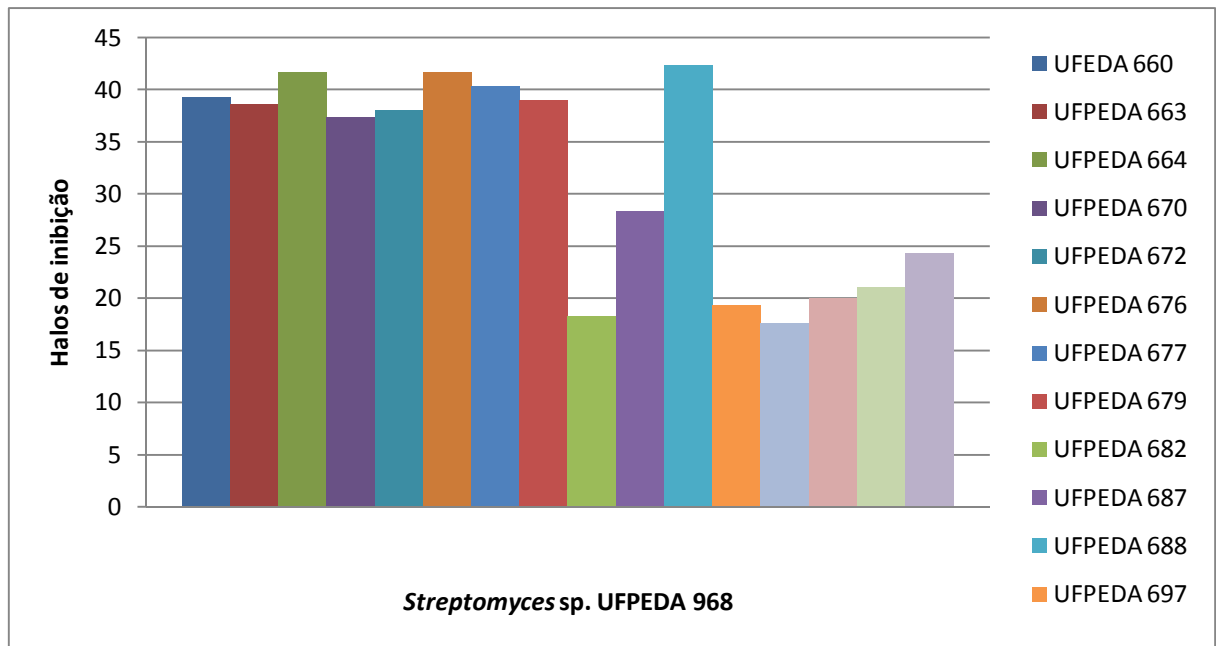


Figura 3: Médias dos diâmetros dos halos de inibição da actinobactéria AEU 1, frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, depositados na coleção de culturas UFPEDA. O isolamento das cepas apresenta diferentes origens. As linhagens UFPEDA 670, 672, 688, 709, 730 e 733, apresentam perfil de multirresistência.

O potencial produtor de compostos bioativos pelo gênero *Streptomyces* vem sendo relatado por diversos autores [20, 21,22]. De acordo com Andersom & Weelington [20], grande parte dos metabólitos bioativos produzidos por actinobactérias, é originária do gênero *Streptomyces*. Pesquisas recentes proporcionaram a descoberta de sete novos antibióticos a partir de *Streptomyces* endofíticos com expressiva atividade contra o parasita da malária (*Plasmodium falciparum*). Estas observações sugerem que micro-organismos endofíticos constituem uma importante fonte para a descoberta de novos antibióticos e outras substâncias com potencialidades biotecnológica, farmacológica e agrícola.

4. CONCLUSÃO

A actinobactéria isolada da folhas de *E. uniflora*, *Streptomyces* sp. UFPEDA 968 produz compostos bioativos de elevada ação antimicrobiana, inibindo o crescimento tanto de bactérias (Gram-positivas, negativas e álcool ácido resistente) como de fungos. Ação anti-*S. aureus* apresentou destaque, tendo a actinobactéria efeito contra isolados clínicos recentes, incluindo cepas com multirresistência. Pesquisas visando o isolamento e caracterização estrutural destes compostos, bem como a identificação molecular desse micro-organismo são alvos do nosso grupo e possuem impacto imediato na indústria agrícola, farmacológica, alimentícia e de cosmético, contribuindo para o desenvolvimento social, econômico e científico.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pelo apoio financeiro.

-
1. LOPES, M.M. Composição Química, Atividade Antibacteriana e Alelopática dos Óleos Essenciais de *Eugenia uniflora* L. e *Myrciaria glazioviana* (kiaersk) G.M. Barroso & Sobral (*Myrtaceae*) . [Dissertação]. [Brasil]: Universidade Federal de Viçosa; 60p. (2008).
 2. PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 29: 62-76 (2002).
 3. PILEGGI, S.A.V. Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico.[Tese].[Brasil]: Universidade Federal do Paraná 141p.(2006).
 4. VIEIRA, T.R.; BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A.; PAULA, V.F.; NASCIMENTO, E.A. Constituintes químicos de *Malaleuca alternifolia* (Myrtaceae), *Revista Química Nova*. 27: 536-539. (2004).
 5. DE OLIVEIRA, R.N.; DIAS, I.J.M.; CÂMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC de diferentes localidades de Pernambuco. *Revista Brasileira Farmácia* 15: 39-43. (2005).
 6. SILVA, F.; CASALI, V.W.D. Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais. 2000.Viçosa – MG.
 7. APEL, M.A.; SOBRAL, M.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. Essential oil composition of four *Plinia* species (Myrtaceae). *Journal Flavour and Fragrance* 21: 565-567. (2006).
 8. RODRIGUES, K. Identificação, Produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. Porto Alegre. 2006.
 9. TONIAL, F. Atividade antimicrobiana de endófitos e extratos foliares de *Schinus terebenthifolius Raddi* (Aroeira) [Dissertação]. [Brasil]:Universidade Federal do Paraná .2010. 138p.
 10. PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic Fungi of *Stylosanthes*. *Mycology* 85: 362-364. (1993).
 11. ARAÚJO W.L. de; MACCHERONI, Jr.W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; Azevedo JL. Variability and interactions between endophytic bacteria and

- fungi isolated from leaf tissues of *Citrus* rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology* 47; (3): 229-236. (2001).
12. UETANABARO, A.P.T. Taxonomia e Triagem da Atividade Antimicrobiana e Antitumoral de Actinomicetos raros isolados de *Tocoyema formosa* (cham. et Sch) K. Shum. [Tese]. [Brasil]: Universidade de Campinas. 110p. (2004).
 13. SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology* 16; (3): 313-340. (1966).
 14. ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OSAKI, A. Improvement of Kasugamicin-producing strain by the agar piece method and phototroph method. *Folia Microbiologica* 16: 218-224. (1971).
 15. SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Revista Acta Amazonica*. 34; (2): 185-195. (2004).
 16. WALKMAN & HENRICI. BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology. 1943. 2452-2492.
 17. LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.P. Biology of *Actinomycetes*. *Annals. of Microbiology* 21: 71-100. (1967).
 18. COOMBS, J.T.; FRANCO, C.M.M. Isolation and Identification of actinobacteria from surface-sterelized wheat roots. *Applied And Environmental Of Microbiology*. 69: 5603-5608. (2003).
 19. CAO, L.; QUI, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface – sterilezed tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Letters in Applied Microbiology* 39: 425-430. (2004).
 20. ANDERSON, A.L.; WELLINGTON, E.T. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 797-814. (2001).
 21. CUNHA, I.G.B. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos pelo endófito *Streptomyces* sp. EBR-49-A UFPEDA. *Revista Brasileira de Farmácia* 90; (2): 120-123. (2009).
 22. LIMA, V.T. Isolamento e atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos e da rizosfera de Melão-de-São Caetano. [Dissertação]. [Brasil]:Universidade Federal de Pernambuco; 79p. (2006).
 23. SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETROLINI, B.; BORGONORI, G.E.; MERLI, S. Isolation of Endophytic *Streptomyces* strains surface sterilezed roots. *Applied And Environmental Microbiology* 58: 2691-2693. (1992).
 24. TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from select plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 381-385. (2003).