

## Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina<sup>1</sup>

Juanize M. Silva<sup>2</sup>, Ellen L. Clementino<sup>2</sup>, Márcia N. Carneiro da Cunha<sup>2</sup>, Késsia P.S. Porfírio<sup>3</sup>, Rinaldo A. Mota<sup>2</sup>, Maria F.S. Teixeira<sup>4</sup>, Tatiana S. Porto<sup>5</sup>, Ana L.F. Porto<sup>2\*</sup> e Camila S. Porto<sup>6</sup>

**ABSTRACT.**- Silva J.M., Clementino E.L., Carneiro da Cunha M.N., Porfírio K.P.S., Mota R.A., Teixeira M.F.S., Porto T.S., Porto A.L.F. & Porto C.S. 2016. [Antimicrobial activity of bioactive molecules produced by *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 against *Staphylococcus* spp. multi-drug resistant isolates from mastitis buffalo.] Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(9):805-810. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: [analuporto@yahoo.com.br](mailto:analuporto@yahoo.com.br)

Mastitis is an inflammation in one or more mammary glands which can lead to reduction in production and quality of milk causing economic losses to dairy farming. The use of antibiotics is the key for the treatment of this disease, but in many cases ineffective due to bacterial resistance already known for this condition. The aim of this study was to select strains of *Streptomyces* spp. producing biomolecules with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus* isolated from buffaloes with mastitis, as well as to determine the best production parameters to the evaluation of simultaneous production of clavulanic acid. Thirty species of *Streptomyces* spp. were used to selecting the greatest producer spectrum of antimicrobial activity (agar block technique), with selection of *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, and 7 multidrug-resistant *Staphylococcus* spp. sensitive to its biocompounds. The selected strain of *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 was cultured in different conditions predetermined by the factorial design 2<sup>4</sup>, where the independent variables were: soybean concentration (0.5, 1.0, 1.5%), glucose (0, 0.5, 1g/L), agitation (150, 200, 250rpm) and temperature (28, 32, 37°C); all the tests were monitored up to 120 hours of cultivation. All independent variables influenced positively the cell growth, while for antimicrobial activity only the variables temperature and agitation showed positive effects. The antimicrobial bio compounds showed activity against seven multidrug-resistant *Staphylococcus* spp under the conditions: temperature 37°C, agitation 250rpm, with 72 hours of production process. In the tests which showed antimicrobial activity, was also assessed the production of clavulanic acid along with the cultivation. The highest concentration of clavulanic acid was 269.84g/L obtained under the conditions of 1.5% of soybean flour and absence of glucose in 96 hours. The strain *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 was effective against multidrug-resistant strains of *Staphylococcus* spp. of mastitis from buffaloes, still showing concomitantly production of clavulanic acid for pharmaceutical use.

**INDEX TERMS:** *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, *Staphylococcus* spp., antimicrobial, buffaloes mastitis, multi-drug resistance.

<sup>1</sup> Recebido em 13 de julho de 2015.

Aceito para publicação em 9 de junho de 2016.

<sup>2</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brasil. \*Autor para correspondência: [analuporto@yahoo.com.br](mailto:analuporto@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego s/n, Recife, PE 50670-420.

<sup>4</sup> Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Octávio 6200, Coroado I, Manaus, AM 69077-000, Brasil.

<sup>5</sup> Unidade Acadêmica de Garanhuns, UFRPE, Av. Bom Pastor s/n, Garanhuns, PE 55292-270, Brasil.

<sup>6</sup> Universidade Federal do Alagoas (UFAL), Av. Beira Rio s/n, Penedo, AL 57200-000, Brasil.

**RESUMO.** A mastite é uma inflamação na glândula mamária que pode acarretar perdas na produção e na qualidade do leite, gerando prejuízos econômicos para a pecuária leiteira. O tratamento é baseado na utilização de antibióticos, sendo, em muitos casos, ineficazes devido à resistência bacteriana já conhecida para esta doença. O objetivo deste trabalho foi selecionar linhagens de *Streptomyces* spp. produtoras de biocompostos com atividade antimicrobiana frente a isolados do gênero *Staphylococcus* multirresistentes de búfalas com mastite. Bem como, determinar os melhores parâmetros de produção, e avaliar a produção simultânea de ácido clavulânico. A seleção de *Streptomyces* spp. com capacidade de produzir compostos com atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica bloco de gelose. Dentre as 30 espécies de *Streptomyces* spp. testadas, o micro-organismo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 apresentou melhores resultados, sendo capaz de inibir o crescimento de 7 isolados *Staphylococcus* spp. multirresistentes. Posteriormente, a espécie selecionada *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi cultivada em diferentes condições pré-determinadas pelo planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, onde as variáveis independentes foram: concentração de soja (0,5; 1,0; 1,5%), glicose (0; 0,5; 1g/L), agitação (150; 200; 250rpm) e temperatura (28; 32; 37°C) e todos os ensaios do planejamento foram monitorados até 120 horas de cultivo. Todas as variáveis independentes influenciaram positivamente no crescimento celular, enquanto que para atividade antimicrobiana apenas as variáveis temperatura e agitação apresentaram efeitos significativos positivos. O líquido metabólito produzido por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi capaz de inibir o crescimento de sete *Staphylococcus* spp. multirresistentes. As melhores condições de cultivo para a produção de moléculas bioativas por este micro-organismo foi a 37°C, com 250rpm de agitação por período de 72 horas. Nos ensaios que apresentaram atividade antimicrobiana, foi avaliada a produção de ácido clavulânico ao longo do cultivo. A maior concentração de ácido clavulânico foi de 269,84g/L obtidas nas condições de 1,5% de farinha de soja em ausência de glicose no tempo de 96 horas. A linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi eficiente contra *Staphylococcus* spp. multirresistentes isolados de mastite em búfalas, ainda apresentando concomitantemente produção de ácido clavulânico com o potencial uso farmacêutico.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, *Staphylococcus* spp., antimicrobiano, mastite bubalina multirresistência.

## INTRODUÇÃO

Mundialmente consumido, o leite de búfalas possui alta qualidade nutricional, com teores de proteínas, gorduras e minerais superiores ao leite de outros animais, e seu aproveitamento industrial é superior, em comparação ao leite bovino (Barreto et al. 2010). Dentre os fatores que influenciam na qualidade do leite, estão a dieta, a constituição genética, a estação do ano, o estágio de lactação, o manejo da ordenha e a sanidade (Dür et al. 2000).

A criação de bubalinos apresenta problemas sanitários semelhantes à bovinocultura e, dentre esses fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária,

destaca-se a mastite, processo inflamatório, geralmente de caráter infeccioso, no qual está envolvida uma série de micro-organismos, usualmente de origem bacteriana e, possivelmente de fungos, leveduras, algas e, mais raramente, dos vírus (Langoni et al. 2001). A mastite causa prejuízos relacionados à diminuição e qualidade do leite, redução na capacidade produtora dos rebanhos, custos extras com assistência veterinária e, principalmente, a gastos com medicamentos que, muitas vezes, não são eficazes no seu tratamento (Medeiros et al. 2011).

O gênero *Staphylococcus* é considerado como o principal agente etiológico da mastite por apresentar grande incidência e fácil contágio. Também pode ser classificado como um grupo de bactérias multirresistentes, onde, cerca de 95% dos antibióticos comercializados e utilizados, na pecuária, são ineficazes (Bezerra et al. 2009, Nader et al. 2007, Oliveira 2006).

A disseminação do uso inadequado de antibióticos acarretou a seleção e desenvolvimento de defesas das bactérias aos agentes antimicrobianos, desencadeando o surgimento da resistência bacteriana (Silveira et al. 2006). Um dos mecanismos de resistência que as bactérias apresentam é produzir  $\beta$ -lactamases, enzimas que conseguem inativar o anel  $\beta$ -lactâmico dos antibióticos tornando-os inaptos para o tratamento de doenças (Essack 2001). No entanto, sabe-se da existência de inibidores da enzima  $\beta$ -lactamase, como o ácido clavulânico produzido por *Streptomyces clavulagerus*, que pode apresentar pouca atividade antimicrobiana, mas ao ser utilizado em associação com um antibiótico, apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana (Costa et al. 2012).

Uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos fármacos são as actinobactérias, reconhecidas por serem micro-organismos que sintetizam metabólitos antimicrobianos, agentes antitumorais, inseticidas, vitaminas e enzimas. Dentre este grupo de bactérias, destaca-se o gênero *Streptomyces* sp., onde 80% dos antibióticos produzidos por este gênero, são comercializados e utilizados na saúde humana e animal e na agricultura (Panigrahi et al. 2011, Procópio et al. 2012).

Com o aparecimento da resistência bacteriana nos tratamentos de infecções nas glândulas mamárias, em búfalas, existe a necessidade da descoberta de novas biomoléculas eficazes, capazes de inibir bactérias multirresistentes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar potenciais biocompostos com atividade antimicrobiana, frente às bactérias multirresistentes isoladas de mastite em búfalas.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Micro-organismos.** Foram utilizadas 30 espécies de *Streptomyces* spp. isoladas de líquens da Região Amazônica obtidas da coleção de culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA).

A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a 50 linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bubalina da raça Murrah, da Região Nordeste-Brasil, gentilmente cedidos pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Sampaio de Medeiros do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco e classificados como multirresistentes por método molecular e antibiograma,

de acordo com Medeiros et al (2011) são resistentes a penicilina, amoxicilina, cefquinoma, cefalosporina, ciprofloxacina, enrofloxacina, eritromicina, florfenicol, gentamicina, cefalotina, tetraciclina, estreptomicina, norfloxacina, estreptomina, ceftriaxona, nitrofurantoína, doxiciclina, cefalexina, sulfametoxazol+trimetoprima e tetraciclina+neomicina+bacitracina.

As espécies de *Streptomyces* spp. e *Staphylococcus* spp. foram reativadas em meio de cultura ISP-2 (Pridham et al. 1957) e Ágar nutriente, respectivamente, sendo preservadas como cultura estocada em criotubos contendo glicerol a 20% incubados a -80°C.

**Seleção de espécies de *Streptomyces* spp. com atividade antimicrobiana.** Para seleção dos *Streptomyces* produtores de biocompostos com atividade antimicrobiana foi utilizada a técnica bloco de gelose. Foram inoculadas 30 espécies de *Streptomyces* spp. em placa de Petri com meio sólido ISP-2 modificado pela retirada da glicose, incubados em estufa microbiológica a 28°C por 168 horas. Após este período, foram retirados com blocos de cultura com 6mm de diâmetro com o auxílio de um perfurador cortante previamente esterilizado. Os blocos de cultura foram depositados na superfície do meio ágar Müller-Hinton em placas de Petri contendo a bactéria-teste (*Staphylococcus* spp. multirresistentes) semeadas pela técnica *cup-plate* na concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL. As placas foram incubadas em estufa microbiológica na temperatura de 37°C por 24 horas, após este período, a avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada pelo tamanho dos halos de inibição em milímetros, de acordo com Ichikawa et al. (1971).

**Meio de produção de biocompostos com atividade antimicrobiana.** O meio de produção utilizado foi MS-2 (Porto et al. 1996) composto por farinha de soja (2%), glicose (1%) e ainda com a presença de sais: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1% (p/v) de NH<sub>4</sub>Cl, 0,435% (p/v) de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,1mL de solução mineral (100mg de FeSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O em 100 mL de água destilada), com pH inicial 7,2, esterilizado em autoclave a 1 atm por 20 minutos a 121°C.

**Produção de biocompostos antimicrobianos e ácido clavulânico utilizando planejamento fatorial 2<sup>4</sup>.** *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi cultivado em Erlenmeyer de 250 mL de volume, contendo 100 mL do meio de cultivo ISP-2, modificado pela retirada da glicose, incubados em agitador orbital (200rpm) a 28°C por 48 horas. Posteriormente, a cultura obtida foi utilizada como inóculo (concentração celular de 10<sup>8</sup> UFC/mL), no meio de produção (MS-2) em Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio de cultura, nas condições predeterminadas pelo planejamento fatorial 2<sup>4</sup> com quatro pontos centrais (Quadro 1), por 120 horas.

Os efeitos e as possíveis interações das variáveis estudadas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 95%. A análise estatística do planejamento fatorial, incluindo o diagrama de Pareto, foi realizada utilizando o Software *Statistica* 8.0 (Statsoft Inc 2008).

**Avaliação da atividade antimicrobiana.** Foi realizada a cada 24 horas até 120 horas de fermentação em microplacas de 96 poços. Para obter o líquido metabólico livre de células, uma alíquota foi retirada e centrifugada a 12.000rpm por 20 minutos. Em cada poço foi adicionado 50µl do líquido metabólico, e 5µl da cultura da bactéria-teste (*Staphylococcus* sp.) na concentração de 5x10<sup>4</sup> UFC/mL e 45µl do meio Müller Hinton líquido (CLSI 2003). O controle negativo foi realizado sem a presença da bactéria-teste nos biocompostos produzidos *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e o controle positivo com a presença da bactéria teste, sem os biocompostos. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas, após este período, foram determinadas as absorbâncias por um leitor de microplacas a 600nm.

**Determinação da concentração celular.** A concentração celular foi determinada a cada 24 horas até 120 horas de fermentação por peso seco. O conteúdo do frasco foi filtrado em de papel

### Quadro 1. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2<sup>4</sup> na produção de biocompostos com atividade antimicrobiana

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central	Maior (+1)
Farinha de soja (%)	0,5	1	1,5
Glicose (g/L)	0	0,5	1
Rotação (rpm)	150	200	250
Temperatura (°C)	28	32	37

filtro seco previamente pesado. Em seguida, o papel de filtro, juntamente com a massa celular, foi levado em micro-ondas na potência baixa por 10 minutos (Olsson & Nielsen 1997).

**Determinação da concentração do ácido clavulânico.** A concentração de ácido clavulânico, presente no líquido metabólico obtido por fermentação, foi determinada espectrofotometricamente à 311nm. A absorbância corresponde à liberação do produto [1-(8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-25enol) imidazol-] da reação entre ácido clavulânico e imidazol (Bird et al. 1982). As amostras foram analisadas a cada 24 horas até 120 horas de cultivo.

## RESULTADOS

Dentre as 30 linhagens de *Streptomyces* spp. avaliadas por bloco de gelose, 2 demonstraram atividade antibacteriana frente à 7 amostras de *Staphylococcus* spp. multirresistentes isolados de mastite bubalina. Sendo as linhagens *Streptomyces* sp. DPUA 1452 e *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 que obtiveram halos de inibição de 10mm e 15mm, respectivamente. Desta forma, a linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi selecionada para o planejamento fatorial, a fim de determinar os melhores parâmetros na produção de biocompostos antimicrobianos.

Os resultados obtidos pelo planejamento fatorial podem ser visualizados no Quadro 2. Quatro ensaios apresentaram atividade antimicrobiana frente a 7 isolados de *Staphylococcus* spp. multirresistentes, isolados de mastite

### Quadro 2. Resultados da atividade antimicrobiana de biocompostos produzidos por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 em 72 horas de fermentação utilizando planejamento fatorial 2<sup>4</sup>

Ensaio	Soja (%)	Glicose (g/L)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Atividade Antimicrobiana*
1	0,5	0	28	150	-
2	1,5	0	28	150	-
3	0,5	1	28	150	-
4	1,5	1	28	150	-
5	0,5	0	37	150	-
6	1,5	0	37	150	-
7	0,5	1	37	150	-
8	1,5	1	37	150	-
9	0,5	0	28	250	-
10	1,5	0	28	250	-
11	0,5	1	28	250	-
12	1,5	1	28	250	-
13	0,5	0	37	250	+
14	1,5	0	37	250	+
15	0,5	1	37	250	+
16	1,5	1	37	250	+
17 C	1	0,5	32	200	-
18 C	1	0,5	32	200	-
19 C	1	0,5	32	200	-
20 C	1	0,5	32	200	-

- Não apresentou atividade, + apresentou atividade.

bubalina. Observou-se que, somente as variáveis independentes, temperatura e agitação influenciaram significativamente na produção dos antimicrobianos. Ocorrendo assim, a inibição do crescimento bacteriano apenas nos ensaios onde houve a combinação das condições de cultivo temperatura a 37°C e agitação de 250 rpm.

Nos ensaios 13, 14, 15 e 16 obteve-se a produção de antimicrobianos, tendo sido selecionado o ensaio 13 (0,5% de farinha de soja e 0 g/L de glicose) por ser composto com menores níveis de concentração de farinha de soja e de glicose. Visto que, as variáveis independentes concentração de carbono e nitrogênio não foram estatisticamente significativas para a produção do antimicrobiano. A maior produção de biocompostos com atividade antimicrobiana por

**Quadro 3. Produção do ácido clavulânico (mg/L) por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 nas condições 37°C em 250 rpm e as concentrações de farinha de soja (1,5 %/ 0,5%) e de glicose (0 g/L / 1 g/L) até 120 horas de fermentação**

Ensaio	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
13	0	0	34,61	257,92	30,61
14	0	0	47,23	269,84	22,92
15	0	0	32,15	256,38	99,84
16	0	0	40,30	265,61	115,23

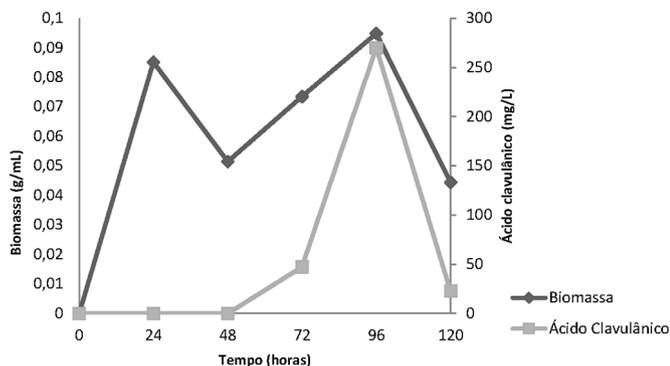


Fig.1. A curva de crescimento e produção de ácido clavulânico do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 cultivados no meio MS-2 nas condições do ensaio 14 em agitador orbital por 120 horas.

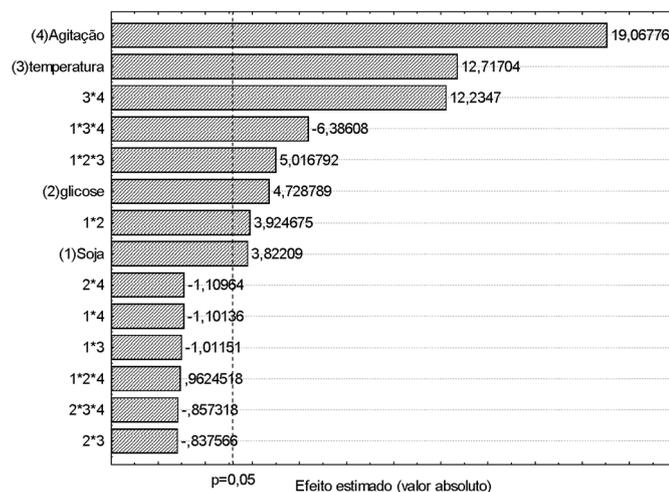


Fig.2. Gráfico de Pareto demonstrando a influência das variáveis independentes e suas interações sob a variável resposta crescimento celular no tempo de 72 horas de fermentação do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.

*Streptomyces parvulus* DPUA 1573 ocorreu com 72 horas de fermentação.

Nos ensaios que apresentaram atividade antimicrobiana, a produção do ácido clavulânico foi determinada, e os resultados podem ser observados no Quadro 3. A presença do ácido clavulânico, no líquido metabólito, foi detectada a partir de 72 horas de fermentação até 120 horas, tendo como melhor tempo de produção 96 horas. O ensaio 14 (1,5% farinha de soja, 0g/L glicose) apresentou maior concentração de ácido clavulânico de 269,84mg/L (Fig.1).

O crescimento celular de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi analisado estatisticamente, tendo todas as variáveis independentes com efeito significativo e positivo, podendo ser visualizado no gráfico de Pareto (Fig.2). A variável que apresentou maior influência sob o crescimento microbiano foi agitação, seguido da temperatura e da interação entre essas variáveis.

## DISCUSSÃO

A mastite é a enfermidade de maior impacto sobre a indústria leiteira, por afetar quantitativa e qualitativamente a produção e, conseqüentemente, levando, desta forma, a prejuízos consideráveis aos produtores (Portes et al. 2013). Espécies de *Staphylococcus aureus* destacam-se como principais agentes etiológicos causadores de mastite em rebanhos bovinos e bubalinos (Mello-Peixoto et al. 2012, Saeki et al. 2012, Marques et al. 2013, Portes et al. 2013, Moreira et al. 2014).

Medeiros et al. (2011) afirmaram que os micro-organismos isolados de mastite bubalina, utilizados neste estudo, apresentam diferentes padrões de resistência (18 tipos de antibióticos e 2 associações), descrevendo dois principais mecanismos de resistência bomba de efluxo e genes associados com a resistência a  $\beta$ -lactâmicos amplificados por PCR (genes *mecA* e *blaZ*) indicando uma possível produção da enzima  $\beta$ -lactamase por estes micro-organismos. Esse fato justifica a baixa sensibilidade desses isolados ao líquido metabólito produzido por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. Entretanto, a atividade obtida deve-se à produção simultânea de biocompostos com atividade antimicrobiana com ácido clavulânico (AC).

Estes resultados corroboram com os descritos na literatura, quando Carneiro da Cunha et al. (2010) estudaram a produção de inibidores de  $\beta$ -lactamases por *Streptomyces* spp. DPUA 1542 frente à *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina isolados de mastite bovina de rebanhos do Estado de Pernambuco-Brasil, observaram a inibição de crescimento de 15 isolados de mastite bovina dentre os 17 testados. Nascimento et al. (2014) avaliaram a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana por 67 *Streptomyces* spp. isolados de líquens da Região Amazônica, os biocompostos produzidos foram testados frente a isolados de mastite caprina (*Staphylococcus aureus* não resistentes) de rebanhos do Estado de Pernambuco. Tais autores verificaram a formação de halos de inibição que variaram de 18 a 26mm. Alberton et al. (2006) estudaram a ação antimicrobiana do líquido metabólito obtido a partir de fermentação por *Streptomyces viridosporus* T7A, e a inibição do crescimento das bactérias Gram negativas (*Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp.e *Escherichia coli*) não foi verificada. Entretanto, os autores

observaram a formação de halos de inibição nas culturas de *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite bovina.

Para produção de biocompostos, o estudo da composição do meio e das condições de cultivo do micro-organismo são fatores primordiais para obtenção de melhores rendimentos em menor tempo de produção. Os resultados do planejamento da produção de biocompostos, com atividade antimicrobiana por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, indicam que as variáveis agitação e temperatura influenciaram, significativa e positivamente, a produção desses biocompostos, ou seja, em maiores níveis de agitação e temperatura ocorre uma maior produção do antimicrobiano. A agitação é uma variável independente que afeta a aeração do meio de cultivo, visto que favorece a homogeneização dos compostos, melhora transferência de oxigênio e facilita a absorção de nutrientes pelo micro-organismo, desta forma, levando a um aumento na produção de biocompostos. Augustine et al. (2004) analisando também as condições de cultivo, na produção de antimicrobianos por *Streptomyces* sp. PU 23, selecionaram o maior valor de agitação 250 rpm, assim como ocorreu neste estudo.

Em relação à temperatura, neste estudo, a produção dos biocompostos com atividade antimicrobiana foi observada a 37°C, semelhante ao trabalho de Narayana e Vijayalakshmi (2008) ao estudarem a influência de diferentes temperaturas (15-45°C) sob a produção de antimicrobianos por *Streptomyces albidoflavus*, obtiveram melhores resultados quando utilizaram a temperatura de 35°C.

As variáveis independentes concentração de soja e de glicose (fontes de nitrogênio e carbono) não foram significativas estatisticamente, portanto, optou-se por utilizar os menores níveis dessas variáveis, devido à redução do custo de produção, favorecendo o escalonamento e o processo industrial da produção de biocompostos com atividade antimicrobiana. Essas fontes de nutrientes são comumente relatadas na literatura para a produção de antimicrobianos, os autores Singh et al. (2009) e Kandula & Terli (2013) estudando a influência de diferentes fontes de nitrogênio (caseína, extrato de levedura, peptona, farinha de soja, cloreto de amônio, ureia, citrato de amônio, nitrato de amônio, sulfato de amônio, nitrato de potássio, nitrato de sódio, extrato de carne e triptona) e de carbono (frutose, amido, lactose, manitol, glicose, arabinose, maltose, galactose, xilose, glicerol e meso-inositol) na produção de compostos antimicrobianos por *Streptomyces tanashiensis* A2D e *Streptomyces coeruleorubidus* BTSS-301 respectivamente, verificaram que os melhores resultados de produção foram utilizando farinha de soja e glicose como fonte de nitrogênio e carbono, respectivamente.

A síntese de antimicrobianos pelo gênero *Streptomyces* ocorre geralmente na fase estacionária do seu crescimento, podendo ser classificados como metabólitos secundários (Wohlleben et al. 2012). Esse fato foi observado durante a produção de biocompostos com atividade antimicrobiana por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, que ocorreu com 72 horas de cultivo no início da fase estacionária de crescimento. O mesmo perfil de produção foi observado por Reddy et al. (2011) durante a produção de antimicrobianos por *Streptomyces rochei*, tendo seu melhor tempo com

72 horas de fermentação. No entanto, Silva-Lacerda et al. (2015) analisando a produção de metabólitos bioativos antimicrobianos produzidos por *Streptomyces parvulus* C1.129 (UFPEDA-3408) obtiveram seu melhor tempo de produção após 96 horas.

O ácido clavulânico é um potente inibidor da enzima  $\beta$ -lactamase, produzido industrialmente como metabólito secundário por *Streptomyces clavuligerus* (Saudagar et al. 2008), entretanto, neste trabalho foi, pela primeira vez, relatado a produção desta biomolécula pela espécie *Streptomyces parvulus*.

Domingues et al. (2010) e Viana-Marques et al. (2011) estudaram a produção de AC por espécies de *Streptomyces* e obtiveram maiores valores de produção em comparação com os obtidos no presente estudo. Entretanto, esses resultados podem ser justificados devido à fonte de carbono utilizada por esses autores (glicerol), visto que, o glicerol é a fonte de carbono que participa diretamente na biossíntese do ácido clavulânico. Portanto, modificar a fonte de carbono pode ocasionar uma diminuição na produção do AC (Bellão et al. 2013). Também é possível ressaltar que o melhor tempo de produção relatado pelos autores anteriormente citados foi de 144 horas. Sendo este tempo de produção superior ao obtido nesta pesquisa (96 horas). Na indústria, menor o tempo de produção significa menor custo, sendo assim mais favorável.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que as condições de cultivo da linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foram essenciais para o crescimento celular e produção de antimicrobianos frente bactérias *Staphylococcus* spp. multirresistentes isoladas de búfalas com diagnóstico de mastite.

O micro-organismo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 produziu, simultaneamente, substâncias antimicrobianas e ácido clavulânico.

**Agradecimentos.** - Os autores agradecem o apoio financeiro do RENORBIO/CNPq, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

## REFERÊNCIAS

- Alberton L.R., Vandenberghe L.P.S. & Joineau M.E. 2006. Avaliação do potencial de uso do extrato bruto da fermentação por *Streptomyces viduospurium* T7A em medicina veterinária. Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar 9:41-47.
- Augustine S.K., Bhavsar S.P., Baserisalehi M. & Kapadnis B.P. 2004. Isolation, characterization and optimization of antifungal activity of an actinomycete of soil origin. Indian J. Exp. Biol. 42:928-932.
- Awad H.M. & El-Shahed K.Y.I. 2013. A novel *Actinomycete* sp. isolated from egyptian soil has  $\beta$ -lactamase inhibitor activity and belongs to the *Streptomyces rochei* phylogenetic cluster. W. Appl. Sciences J. 21(3):360-370.
- Barreto M.L.J., Rangel A.H.N., Araújo V.M., Bezerra K.C., Medeiros H.R., Oliveira J.P.F. & Andrade K.D. 2010. Análise de correlação entre a contagem de células somáticas (ccs), a produção, o teor de gordura, proteína e extrato seco total do leite bubalino, ACSA - Agropec. Cient. no Semi-Árido 6(02):47-53.
- Bellão C., Antonio T., Araujo M.L.G.C. & Badino A.C. 2013. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* under different fed-batch conditions. Braz. J. Chem. Eng. 30(2):257-266.

- Bezerra D.A.C., Pereira A.V., Lôbo K.M.S., Rodrigues O.G., Athayder A.C.R., Mota R.A., Medeiros E.S. & Rodrigues S.C. 2009. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. *Revta Bras. Farmacogn.* 19(4):814-817.
- Bird A.E., Bellis J.M. & Gasson B.C. 1985. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. *Analyst* 107:1241-1245.
- Cunha M.N.C., Silva N.M.V., Teixeira M.F.S., Mota R.A., Lima-Filho J.L., Porto T.S. & Porto A.L.F. 2010. Actinomicetos produtores de inibidores de  $\beta$ -lactamases com atividade antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62(6):1312-1319.
- Dürr J.W., Fontaneli R.S. & Burchard J.F. 2000. Fatores que afetam a composição do leite. In: Curso de sistemas de produção para gado de leite baseado em pastagens sob plantio direto. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.
- Essack S.Y. 2001. The development of  $\beta$ -Lactam antibiotics in response to the evolution of  $\beta$ -lactamases. *Pharmace. Res.* 18(10):1391-1399.
- Faden M.S., Qattan W.T., Moneib N.A. & Yassien M.A. 2011. Isolation of antimicrobially active *Streptomyces* strain from West Area of Saudi Arabia. *J. Pharm. Res.* 4(7):2322-2324.
- Ichikawa T., Date M., Ishikura T. & Ozaki A. 1971. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol., Praha*, 16:218-224.
- Kandula S.K. & Terli R. 2013. Production, purification and characterization of an antimicrobial compound from marine *Streptomyces coeruleorubidus* BTSS-301. *J. Pharm. Res.* 7:397-403.
- Kumar V., Bharti A., Negi Y.K., Gusain O.P. & Bisht G.S. 2012. Taxonomy and antimicrobial activity of moderately salt-tolerant and alkaliphilic *Streptomyces* sp. MN 9(V) isolated from solitary wasp mud nest. *Ann. Microbiol.* 62:979-985.
- Langoni H., Domingues P.F., Molero J.R. & Baldini S. 2001. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Ars Vet.* 17(3):213-217.
- Letícia C.G., Domingues L.C.G., Teodoro J.C., Hokka C.O., Badino A.C. & Araújo M.L.G.C. 2010. Optimization of the glycerol-to-ornithine molar ratio in the feed medium for the continuous production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Biochem. J. Engine.* 53(1):7-11.
- Marques V.F., Souza M.M.S., Mendonça E.C.L., Alencar T.A.A., Pribul B.R., Coelho S.M.O., Lasagno M. & Reinoso E.B. 2013. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):161-170.
- Medeiros E.S., França C.A., Krewer C.C., Peixoto R.M., Souza-Junior A.F., Cavalcante M.B., Costa M.M. & Mota R.A. 2011. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 23(4):793-796.
- Medeiros E.S., Freitas M.F.L., Saukas T.N., Azevedo S.S., Pinheiro-Junior J.W., Branderpim D.F., Neto O.L.S. & Mota R.A. 2011. Risk factors associated with buffalo mastitis in the Brazilian Northeast. *Pesq. Vet. Bras.* 31(6):499-504.
- Mello-Peixoto E.C.T., Moreira G.M.B., Figueiredo A., Matsumoto L.S., Silva Gonçalves R.M. & Domingues P.F. 2014. Extrato aquoso de *Punica granatum* Linn. no tratamento de mastite bovina subclínica. *Cadernos de Agroecologia*, ISSN 2236-7934-9(1).
- Moreira G.M.B., Matsumoto L.S., Silva R.M.G., Domingues P.F. & Mello-Peixoto E.C.T. 2014. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. *Pesq. Vet. Bras.* 34(7):626-632.
- Narayana K.J.P. & Vijayalakshmi M. 2008. Optimization of antimicrobial metabolites production by *Streptomyces albidoflavus*. *Res. J. Pharmacol.* 2(1):4-7.
- Nascimento T.P., Porto C.S., Teixeira M.F.S., Porto T.S. & Porto A.L.F. 2014. Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. ante isolados de mastite caprina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66(1):101-108.
- Nader Filho A., Ferreira L.A., Amaral Junior O.D.R. & Oliveira R.P. 2007. Sensibilidade Antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 74(1):1-4.
- NCCLS 2003. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
- Oliveira A.L. 2006. Resistência bacteriana a antibióticos: Uma análise da conduta hospitalar. *Revta Cesumar-Ciênc. Hum. Soc. Apl.* 11(1):59-69.
- Panigrahi T., Kumar G., Karthik L. & Rao K.V.B. 2011. Screening of antimicrobial activity of novel *Streptomyces* sp. VITTKGB isolated from agricultural land of Vellore, TN, India. *J. Pharma. Res.* 4(6):1656-1658.
- Portes V.M., Vaz A.K. & Sordelli D.O. 2013. Ocorrência dos sorotipos capsulares de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bubalina no Brasil. *Vet. Zootec.* 20:193-195.
- Porto A.L.F., Campos-Takaki G.M. & Lima Filho J.L. 1996. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 60(2):115-122.
- Pridham T.G., Aderson P., Foley C., Lindenfelser L.A., Hesseltine C.W. & Benedict R.G.A. 1957. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiot. Manual* 1:947-953.
- Procopio R.E.L., Silva I.R., Martins M.K., Azevedo J.L. & Araújo J.M. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Braz. J. Infect. Dis.* 16(5):466-471.
- Ramirez-Malule H., Junne S., López C., Zapata J., Sáez A., Neubauer P. & Rios-Esteva R. 2016. An improved HPLC-DAD method for clavulanic acid quantification in fermentation broths of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 120:241-247.
- Saeki E.K., Mello-Peixoto E.C.T., Matsumoto L.S., Marcusso P.F. & Monteiro R.M. 2011. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus* sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. *Acta Vet. Bras.* 5(3):283-290.
- Saudagar P.S., Survase S.A. & Singhal R.S. 2008. Clavulanic acid: a review. *Biotechn. Advances* 26(4):335-351.
- Shaikh S., Fatima J., Shakil S., Mohd S., Rizvi D. & Kamal M.A. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 22:90-101.
- Silveira G.P., Nome F., Gesser J.C., Sá M.M. & Terenzi, H. 2006. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova* 29(4):844-855.
- 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. 2015. Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. *Genet. Mol. Res.* 15(1):1-12.
- Singh L.S., Mazumber S. & Bora T.C. 2009. Optimization of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *J. Mycol. Méd.* 19(4):225-233.
- Sripreechak P., Tanasupawat S., Matsumoto A., Inahashi Y., Suwanborirux K. & Takahashi Y. 2013. Identification and antimicrobial activity of actinobacteria from soils in southern Thai. *Trop. Biomed.* 30(1):46-55.
- Thakur D., Bora T.C., Bordoloi G.N. & Mazumdar S. 2009. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *J. Mycol. Méd.* 19(3):161-167.
- Viana-Marques D.A., Cunha M.N.C., Araújo J.M., Lima-Filho J.L., Converti A., Pessoa-Junior A. & Porto A.L.F. 2011. Optimization of clavulanic acid production by *Streptomyces* sp. DAUFPE 3060 by response surface methodology. *Braz. J. Microbiol.* 42(2):658-667.
- Viana-Marques D.A., Santos-Ebinuma V.C., Oliveira P.M.S., Lima G.M.S., Araújo J.M., Lima-Filho J.L., Converti A., Pessoa-Junior A. & Porto A.L.F. 2014. Screening wild type *Streptomyces* isolates able to overproduce clavulanic acid. *Braz. J. Microbiol.* 45(3):919-928.
- Vijayakumar R., Muthukumar C., Saravanamuthu R., Panneerselvam K., Thajuddin N. & Panneerselvam A. 2012. Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India. *Indian J. Microbiol.* 52(2):230-239.