

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE
MANGUEZAIS**

SARAH PIGATO CANOVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas - ICB IV da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo

SÃO PAULO
JANEIRO 2009

RESUMO

CANOVA, S. P. Diversidade e Bioprospecção de Actinobactérias Isoladas de Manguezais. 66 f. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Manguezais são ecossistemas costeiros que ocorrem na transição entre os ambientes terrestres e marinhos, ao longo das regiões tropicais e subtropicais, sofrendo influência direta do regime das marés. A comunidade microbiana diversificada é fundamental para a ocorrência da ciclagem de nutrientes e, portanto, manutenção da biodiversidade faunística e florística nestes ambientes. As actinobactérias correspondem um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas, que naturalmente habitam o solo, adaptam-se às diversas condições do ambiente, produzem antibióticos e são capazes de colonizar a rizosfera e tecidos internos das plantas. Neste trabalho foi possível observar a diversidade de actinobactérias rizosféricas isoladas nos manguezais de Cananéia e Bertioga – SP; avaliar a produção de metabólitos secundários antifúngicos desses microrganismos; analisar o perfil químico dos extratos orgânicos das actinobactérias por espectrômetro de massas, seguidos de avaliação dos constituintes químicos desses extratos por cromatografia em camada delgada e coluna preparativa para separação dos mesmos, onde após os bioensaios com as frações ativas, foi determinado a concentração inibitória mínima dessas frações.

Palavras-chave: Actinobactérias, Microrganismos Rizosféricos, Bioprospecção, Manguezal.

ABSTRACT

CANOVA, S. P. Diversity and Bioprospection of Actinobacteria from Mangroves. 66 f. 2009. Master thesis (Biothechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Mangroves are coastal ecosystems which occur in the areas of transition between marine and terrestrial environments throughout the tropical and subtropical regions, suffering direct tide influence. The diverse microbial communities are important to the nutrient cycling occurrence and consequently to the maintenance of these environments fauna and flora biodiversity. The Actinobacteria are a heterogeneous group of filamentous bacteria that naturally inhabit the soil. They can easily adapt to different environmental conditions, producing antibiotics and colonizing the rhizosphere and plants internal tissues. This study aims were: to allow the assessment of the diversity of the diversity of rhizosphere Actinobacteria isolated from mangroves located in Cananea and Bertioga, cities under the jurisdiction of Sao Paulo State; to evaluate the production of antifungal secondary metabolites of these microorganisms; to analyze the chemical profile of organic extracts of Actionobacteria by mass spectrometry, followed by the evaluation of the chemical components of theses extracts through thin-layer chromatography and preparative column for their separation. After this process minimum inhibitory concentration of the active fractions of the bioassays were determined.

Key-words: Actinobateria, Rhizospheric Microorganisms, Bioprospection, Mangrove.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma das maiores extensões de manguezais do mundo, ocorrendo desde o Cabo Orange no Amapá se estendendo ao longo do litoral Sudeste-Sul brasileiro, margeando estuários, lagunas e enseadas culminando no Município de Laguna, em Santa Catarina. Os manguezais abrangem uma superfície total de mais de 10.000 km², existindo no Estado de São Paulo mais de 231 km² desses ambientes.

Os manguezais são ecossistemas particulares que se estabelecem em regiões tropicais costeiras de todo o globo originando-se a partir do encontro de águas doces e salgadas formando águas salobras. A comunidade microbiana diversificada é fundamental para a ciclagem de nutrientes e, portanto, manutenção da biodiversidade faunística e florística nestes ambientes. É nas imediações das raízes (rizosfera) que os microrganismos encontram os substratos que necessitam para sua proliferação.

As actinobactérias são importantes, pois podem conferir ao seu hospedeiro, características como maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, suprimento de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento vegetal e outros componentes biotecnológicos (enzimas e fármacos).

Em produtos naturais de microrganismos tem sido observada a inibição ou a morte de ampla variedade de agentes prejudiciais causadores de doenças, ou fitopatógenos, como bactérias, fungos, vírus e protozoários que afetam o homem, plantas e animais. Actinobactérias, bactérias e fungos estão entre os produtores de metabólitos secundários mais conhecidos. A vasta maioria de antibióticos em uso é produzida pelas actinobactérias, em particular por membros do gênero *Streptomyces*.

Os antibióticos são metabólitos secundários que se acumulam no meio da cultura no fim da fase de crescimento exponencial (quando se inicia a fase estacionária). Estes produtos não são essenciais para o crescimento e reprodução do microrganismo que os produz. No entanto, em termos competitivos, os microrganismos produtores de antibióticos são favorecidos em relação aos não produtores.

2 CONCLUSÃO

- Foi observada uma baixa densidade de actinobactérias colonizando a rizosfera de *R. mangle* nos manguezais do Estado de São Paulo, com predominância de isolados afiliados à *Streptomyces luridiscabiei*. Tal espécie foi aqui descrita pela primeira vez nesses ambientes.

- As comunidades de actinobactérias presentes na rizosfera de *R. mangle* são moduladas pela proximidade das plantas com o mar (salinidade) e pela contaminação por petróleo (ocorrida no manguezal de Bertioga);

- Os fitopatógenos *P. aphanidermatum* e *Phytophthora* sp. tiveram o crescimento micelial inibido por 75% das actinobactérias avaliadas;

- O sinal de massa (m/z) com valor 1149 foi observado no perfil químico dos extratos orgânicos das actinobactérias capazes de inibir o crescimento micelial dos fitopatógenos testados, provavelmente sendo esta a massa do composto ativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed., New York: John Wiley. 1996.

BARTH, A. L.; BARROS, E.; MACHADO, A. Resistência Bacteriana. In: BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CARAMORI, M.L.; MACHADO, A. **Antimicórbios – consulta rápida**. 3 ed. Porto Alegre: Artimed, 27-31 p. 2001.

BALASURABRAMANIAN, T.; KHAN S.A.; Mangroves of Índia. **Environmental Information System Center**. Centre of Advanced Study in Marine Biology, India: Annamalai University. Parangipettai, Nadu, 2002.

BERG, G., EBERL, L., HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**. 7v. 1673-1685 p. 2005.

CHATER, K. F., HOPWOOD, D. A. *Streptomyces*. In: SONENSHEIN, A.L., HOCH, J.A., LOSICK, R. **Bacillus subtilis and other Gram positive bacteria**, 83-89 p. 1993.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, 34 v. 121-128p. 2000.

COLLINS, H. C.; BRAGA, L. G.; BONATO, S. P. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 9-279 p. 1990.

CORLISS, J. An interim utilitarian ('User-friendly') hierarchical classification and characterization of the protists. **Acta Protozoologica**, 33 v. 1-51 p. 1994.

COWELL, R. R. Microbial biodiversity and biotechnology. In: REAKA-KUDLA, M.L. et. al. **Biodiversity II: Understanding and Protecting our Biological Resources**., Washington: Joseph Henry Press, 1997.

CROSS, T. Growth and examination of actinomycetes – Some guidelines. In: WILLIAMS, S.T., SHARPE, M.E., HOL, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 4 v. 2340 – 2343 p. 1989.

CURY, J. C. Atividade Microbiana e Diversidade Metabólica e Genética em Solo de Manguê Contaminado com Petróleo. 84f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) -

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba – SP. 2002.

da SILVA, K. R. A.; SALLES, J. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, 54 v. 213-231 p. 2003.

de ARAUJO, J. M., da SILVA, A. C., AZEVEDO, J. L., Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of mayze (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives Biology and Technology**, 43 v. 447 – 451p. 2000.

de LUCCA, A. J. Antifungal peptides: potential candidates for the tratament of fungal infections. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 9 v. 2 n. 273-299 p. 2000.

DEMAIN, A. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In: **Secondary metabolites: their function and evolution**. Chichester: J. Wiley, 3-23 p. 1992.

DUKE, N. C. & WATKINSON, A. J. Chlorophyll-deficient propagules of *Avicennia marina* and apparent longer term deterioration of mangrove fitness in oil-polluted sediments. **Marine Pollution Bulletin**. 44 v. 1269 – 12876 p. 2002.

DUKE, N. C., BALL, M. C. & ELLISON, J. C. Factors influencing biodiversity and distributional gradients in mangrove. **Global Ecology and Biogeography**. 7 v., 27 – 47 p. 1998.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G. W. & GUIRADO, N. Doenças dos Citros. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2 v. 261-296 p. 1997.

FLARDH K.; BUTTNER, M. J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews**. 7 v. 36-49 p. 2009.

FRY, W. E.; S.B. GOODWIN. Re-emergence of potato and tomato late blight in theUnited States. **Plant Disease**, 81 v. 12 n. 1349-1357 p. 1997.

GAMERO, R. M. P. Mineralogia, Físico-química e classificação dos solos de mangue do rio Erice no canal de Bertioga (Santos, SP). 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba – SP. 2001.

GOMES, N. C. M.; HEUER, H.; SCHONFELD, J.; COSTA, R.; MENDONCA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, The Hague, 232 v. 167-180 p. 2001.

GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S. T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, 37 v. 189-216 p. 1983.

HANCOCK, R. E. W. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 9 v. 1723-1729 p. 2000.

HERZ, R. Manguezais do Brasil. Instituto Oceanográfico USP – CIRM, São Paulo – SP, 227 p. 1991.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 63 v. 3233-3241 p. 1997.

JARVIS, W. R. **Managing diseases in greenhouse crops**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 288 p. 1992.

KARTZ, E.; DEMAINE, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. **Bacteriological Reviews**, 41 v. 449-474 p. 1977.

KE, L.; WONG, T. W. Y.; WONG, A. H. Y.; WONG, Y. S. & TAM, N. F. Y. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in Hong Kong following an oil spill. **Marine Pollution Bulletin**. 45 v. 339 – 347 p. 2002.

KIRK, P. M., CANNON, P. F., DAVID, J. C. & STALPERS, J. A. **Dictionary of Fungi**. CABI Bioscience, 9 ed., 655 p. 2001.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogenes and cryogenes. **Physiological Reviews**, Bethesda, 71 v. 93-127 p. 1993.

KORN-WENDISCH, F., KUTZNER, H. J. The family Streptomycetaceae. In: BALOWS, A., TRUPER, H.G., DWORKIN, M., SCHULEIFER, K. H. **The prokaryotes**. New York: Springer Verlag, 921 – 995 p. 1992.

LAM, K. S. Discovery a novel metabolites from marine actinomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, 9 v., 245-251 p. 2006.

LAMPARELLI, C. C. & MOURA, D. O. Mapeamento dos ecossistemas costeiros do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, CETESB, 108 p. 1999.

LECHEVALIER, H. A. & LECHEVALIER, M. P. Introduction of the other Actinomycetales. In: STARR, M.P., STOLP, H., TUPER, H.G., BALOW, A., SCHILEGEL, H.G. **The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacterial**. Berlin: Springer-Verlag, 2 v. 1915 – 2123 p. 1981.

LEIFERT, C.; LI, H.; et al. Antibiotics production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. **Journal of Applied Bacteriology**, 75 v. 1995.

LEIVA, P.S., YANEZ, S. M., ZABOR, C.L., et al. **Atividade Antimicrobiana de Actinomycetes Aislados desde Ambientes Acuáticos Del Sur de Chile**. Rev., méd. Chile. (on-line). Fev. 2004, v. 132, n. 2 (Citado 08 de fevereiro de 2006), p. 151 – 159.

LEVY, B. S.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Natural Medicine Supplement**. New York, 10 v. 122-129p. 2004.

LEWIS, R. The rise of antibiotics – resistant infections. **FDA. Consumer Magazine**, 1995.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 37 v. 81-125 p. 1999.

MARSHALL, S. H.; ARENAS, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. **Electronic Journal of Biotechnology** ISSN: 0717-3458, 2003.

MELO I. S. Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas: Descrição e Potencial de Uso na Agricultura. In: MELO, I.S., de AZEVEDO, J.L.. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 87-116 p. 1998.

MELO, F. M. P. Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endofítico de mandioca *Bacillus pumilus*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP. 2005.

MILLER, H. J., HENKEN, G., van VEEN, J. A. Variation and composition of bacterial populations in the rhizosphere of maize, wheat and grass cultivars. **Canadian Journal of Microbiology**, 35 v. 656-660 p. 1989.

MIYADOH, S. Morphology and phylogeny of actinomycetes. In: MIYADOH, S. **Atlas of actinomycetes**. Tokyo : Asakura, p.198-199. 1997.

MORAES, M.C.R.; LAGO, C.L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, 26 v. 4 n. 556-563 p. 2003.

MUYZER, G.; DEWAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16s Ribosomal RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 59 v. 695-700 p. 1993.

PRUDHOMME, J.; McDANIEL E.; PONTS, N.; BERTANI, S.; FENICAL, W.; JENSEN, P.; LE ROCH, K. Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, 151 v., 167-177 p. 2000.

ROBINSON, J.A. enzymes of secondary metabolism in microorganisms. **Chemical Society Reviews**, 17 v. 383-452 p. 1988.

SALLES, J.F.; DE SOUZA, F.A.; Van ELSAS, J.D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 68 v. 1595-1603 p. 2002.

SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETOLINI, B.; BORGONOV, G. E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface, sterilized roots. **Applied Environmental Microbiology**, 58 v. 2691 – 2693 p. 1992.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: Ecosystema entre a Terra e o Mar. São Paulo: Caribbean Ecological Research. 64 p. 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G.; DE-ROSA, T. Brazilian Mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, 3 v. 561-570 p. 2000.

SURAJIT DAS, P. S. L.; AJIMAL KHAN, S. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspective. **Current Science**, 90 v. 10 n. 2006.

TANAKA, Y.; OMURA, S. Agroactive compounds of microbial origin. **Annual Review Microbiology**, 47 v. 57-87 p. 1993.

Van WEST, P.; APPIAH, A. A.; GOW. N. A. R. Advances in research on oomycete root pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 62 v. 99-113p. 2003.

WELLER, D. M. Biological Control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 26 v. 379-407 p. 1988.

ZADOKS, J. C.; et al. **Epidemiology and Plant Disease Management**. New York: Oxford University Press. 427p. 1979