

FLÁVIA MANDOLESI PEREIRA DE MELO

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS DE MILHO (*ZEA MAYS* L.)
COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2009

FLÁVIA MANDOLESI PEREIRA DE MELO

BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS DE MILHO (*ZEA MAYS* L.)

COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo

São Paulo

2009

A Deus pela oportunidade de viver e ser muito feliz ao lado de pessoas amadas;

Aos meus pais Eduardo e Giselle pelo imenso amor, carinho, pelo incentivo de estudar e crescer, pela confiança e pelos lindos sonhos compartilhados;

Ao meu Lindo amor, Fabiano Silva Romão, pelas palavras, risos, amizade, carinho e companheirismo em todos os momentos;

Aos meus irmãos, Fabiano, Francine e Fernanda e meus cunhados Leonardo, Fábio e Vanessa por acreditarem em mim e pela lealdade e amizade eterna;

DEDICO E OFEREÇO!!!

AGRADECIMENTOS

A Embrapa Meio Ambiente, pela infra-estrutura para a realização dos trabalhos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Itamar Soares de Melo pelos ensinamentos;

Ao prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Tânia Petta, Carolina, Jaqueline, Eduardo, Vinícius (RMN) e em especial a Ana Flávia Matinez do laboratório de Química da USP, pela oportunidade de aprender, pela amizade conquistada e pelo apoio em todos os momentos;

A profa. Marli Fiore e a Carolinne Pamplona do Laboratório de Biologia Molecular do CENA/USP, pelo apoio e pela amizade;

Aos amigos queridos, César de Rosso, Marcela Gallo, Lílíana Mattos, Gabriela Gonçalves, Zayame Vegette, Sarah Canova, Luciana Reyes, Luciana Ávila, Rodrigo, Fernando Andreote, Elen dos Santos, Élída Correa, Alexandre Sereda, Lílíia, Angela Valente, Guta, Lílívia, Márcia Parma, João Luis da Silva, Elke, Rosely Nascimento, Elías, Irene, Elínalva, Abrahão, Dra. Sônia, Maria, Márcia e Maria Amélia Toledo, os quais me proporcionaram momentos inesquecíveis, muitos ensinamentos, apoio e uma grande amizade;

A Dra. Shirlei Scramin pela amizade, carinho e pelo apoio valioso em todos os momentos;

A Universidade de São Paulo e ao órgão de fomento CAPES pelo apoio financeiro;

Aos meus amigos e familiares que tornaram o trabalho mais valoroso;

A todos que, embora não mencionados contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Existe apenas uma idade para sermos felizes, apenas uma época da vida de cada pessoa em que é possível sonhar, fazer planos e ter energia suficiente para realizá-los apesar de todas as dificuldades e todos os obstáculos.

Uma só idade para nos encantarmos com a vida para vivermos apaixonadamente e aproveitarmos tudo com toda a intensidade, sem medo nem culpa de sentir prazer.

Fase dourada em que podemos criar e recriar a vida à nossa própria imagem e semelhança, vestirmo-nos de todas as cores, experimentar todos os sabores e entregarmo-nos a todos os amores sem preconceitos nem pudor.

Tempo de entusiasmo e coragem em que toda a disposição de tentar algo de novo e de novo quantas vezes for preciso.

Essa idade tão fugaz na nossa vida chama-se PRESENTE e tem a duração do instante que passa.”

Mário Quintana

RESUMO

MELO, F. M. P. **Bioprospecção de Actinobactérias da rizosfera de milho (*Zea mays* L.) com atividade antifúngica. 105 f.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Actinobactérias ocorrem em diversos ambientes e possuem grande potencial na produção de enzimas, antibióticos e fármacos, tendo amplo uso na agricultura, indústria e outras áreas. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento, a identificação e a bioprospecção de actinobactérias da rizosfera de milho. Foram isoladas 60 linhagens de actinobactérias de plantas sadias de milho, cultivadas em diferentes regiões do Estado de São Paulo. Dessas linhagens, 71% foram capazes de inibir o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (*Pythium aphanidermatum* e *Fusarium moniliforme*), 56% foram capazes de inibir bactérias gram positivas (*Bacillus megaterium* e *Staphylococcus aureus*) e 49% capazes de inibir bactérias gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella*). Dois isolados com maior atividade biológica, CCMA30 e CCMA33, foram identificados por meio do seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA como pertencentes à espécie *Streptomyces griseorubiginosus*. Genes que codificam para a presença de genes PKS (sintases de policetídeos), também foram detectados nessas linhagens. O fracionamento do extrato bruto da linhagem CCMA 33 revelou que a fração 7 (m/z 719-768) apresentou atividade antifúngica, sendo esta submetida a fragmentação induzida por colisão (MS/MS) onde, pelas buscas no dicionário de produtos naturais pode-se confirmar a presença de Julichromes Q₆₋₆ 10`dihidroxi, substância sintetizada por policetídeos. Novas buscas na literatura e em bancos de dados confirmaram a presença de mais duas Julichromes presentes na fração ativa, Julichrome Q₁₋₃ e Julichrome Q₃₋₃. Estes resultados evidenciam a produção de metabólitos secundários de interesse biotecnológico por actinobactérias da rizosfera.

Palavras Chave: Actinobactérias rizosféricas. PKS. Metabólitos secundários. Cromatografia. Bioprospecção. Atividade antifúngica.

ABSTRACT

MELO, F. M.P. **Bioprospection of actinobacteria from maize (*Zea mays L.*) rhizosphere with antifungal activity**. 2009. 105 f. Thesis (PhD in Biotechnology) – Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Actinobacteria occur in different environments and have a great potential in producing enzymes, antibiotics and medical molecules, with a wide use in agriculture, industry and other areas. The present work aimed the isolation, identification and the bioprospection in actinobacteria which colonize the rhizosphere of maize. Sixty strains were isolated from healthy plants of maize, cultivated in different regions of São Paulo State. Among these isolates, 71% were capable of inhibiting the development of the pathogenic fungi (*Pythium aphanidermatum* and *Fusarium moniliforme*), 56% were capable of inhibiting bacteria Gram positive (*Bacillus megaterium* and *Staphylococcus aureus*) and 49% were capable of inhibiting bacteria Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella*). The two isolates with higher biological activity (CCMA30 and CCMA33) were identified by the partial sequencing of the 16S rDNA gene as belonging to the species *Streptomyces griseorubiginosus*. In these isolates it was detected the presence of PKS (polyketide synthase) genes, possibly involved in the production of active compounds evaluated. The fractioning of the crude extract of the strain CCMA 33 has revealed that the fraction 7 (m/z 719-768) displayed antifungal activity and it was submitted to fragmentation induced by collision (MS/MS), where by searches in the dictionary of natural products the presence of Julichrome Q₆₋₆ 10'-dihydroxy synthesized by poliketides could be confirmed. New searches in the literature and database were able to confirm the presence of two other Julichromes in the active fraction, Julichrome Q₁₋₃ and Julichrome Q₃₋₃. These results highlight the production of secondary metabolites of biotechnological interest by actinobacteria which colonize the maize rhizosphere.

Key words: Rhizosphere actinobactérias. PKS. Secondary metabolites. Chromatograph. Bioprospection. Antifungal activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Síntese de ácidos graxos e Policetídeos	29
Figura 2. Alguns exemplos de Policetídeos reduzidos	30
Figura 3. Policetídeos largamente empregados, que apresentam diversas atividades biológicas	31
Figura 4. (A) Vista geral do experimento em casa de vegetação. (B) Estádio de Folhas cotiledonares em pepino.....	47
Figura 5. Teste de antagonismo das linhagens CCMA 30 e CCMA 33	51
Figura 6. (A) Actinobactéria CCMA 33 cultivada em meio sólido ACA; (B) Actinobactéria CCMA 30 cultivada em meio sólido ACA	52
Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura da linhagem CCMA 30.....	52
Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura da linhagem CCMA 33.....	53
Figura 9. Relações filogenéticas entre a seqüência parcial de 16S rRNA das linhagens CCMA 30 e CCMA 33 e de outras linhagens de <i>Streptomyces</i> retiradas do RDP database	56
Figura 10. O gel de agarose mostrando bandas que apresentam genes que codificam para a enzima NRPS.....	58
Figura 11. Gel de agarose mostrando bandas que apresentam genes que codificam para a enzima PKS	58
Figura 12. (A-B) Curva de crescimento da linhagem CCMA 30 e CCMA 33, pelo método de contagem em placas UFC/mL, (C-D) Curva de crescimento da linhagem CCMA 30 e CCMA 33, pelo peso seco (g), (E-F) Curva de crescimento da linhagem CCMA 30, pelo análise de pH	61
Figura 13. Teste de antibiose dos extratos (280µg/mL) da linhagem CCMA33 e CCMA 30 contra o patógeno <i>Pythium aphanidermatum</i>	62
Figura 14. (A) Placa de CCD da linhagem CCMA 30 com 8 “spots” reveladas com anisaldeído (B) Placa de CCD da linhagem CCMA 33 com 9 “spots” reveladas com anisaldeído.....	64

Figura 15. Bioautografia realizada com as frações obtidas pela CCD da linhagem CCMA 33, onde a fração com Rf 7 apresentou halo de inibição contra a bactéria, <i>Bacillus megaterium</i> .	66
Figura 16. (A) Atividade antimicrobiana da Fração 7 e 8 da linhagem CCMA 33 com a CMI de 140µg/mL contra o patógeno <i>Pythium aphanidermatum</i> ; (B) Atividade antimicrobiana da Fração 7 e 8 da linhagem CCMA 33 com a MIC de 140µg/mL e 70 µg/mL contra <i>Bacillus megaterium</i> .	68
Figura 17. A) Espectros de massas IES- do extrato bruto da linhagem CCMA 30 e B) Espectros de massas IES+ do extrato bruto da linhagem CCMA 30.	70
Figura 18. A) Espectros de massas IES- do extrato bruto da linhagem CCMA 33 e B) Espectros de massas IES+ do extrato bruto da linhagem CCMA 33	71
Figura 19. Cromatograma do extrato bruto da linhagem CCMA 33 com tempos de retenção dos picos que apresentaram intensidade.	72
Figura 20. Cromatograma do extrato bruto da linhagem CCMA 30 com tempos de retenção dos picos que apresentaram intensidade.	72
Figura 21. (A) Espectro de massas da fração 7 (CCMA 33) utilizando a fonte de ionização por eletrospray, em modo positivo (IES +).(B) Espectro de massas da fração 8 (CCMA 33) utilizando a fonte de ionização por eletrospray, em modo positivo (IES +)	74
Figura 22. A) Ampliação da região de sinais que apresentaram maior intensidade na fração 7 e B) Região de sinais que apresentaram maior intensidade na fração 8	74
Figura 23. Cromatograma da fração 7 com tempos de retenção dos picos com maior intensidade	75
Figura 24. Cromatograma da fração 8 (33) com tempos de retenção dos picos com maior intensidade	75
Figura 25. (A) Espectro de massas da fração 5, linhagem CCMA 30 em modo negativo (IES-) (B) Espectro de massas da fração 5, linhagem CCMA 30 em modo positivo (IES+)	76
Figura 26. Cromatograma da fração 5 com tempos de retenção dos picos com maior intensidade	77
Figura 27. Espectros de MS/MS a) íon de m/z 719, b) m/z 733 e c) m/z 751 presentes na fração 7 da linhagem CCMA 33	79

Figura 28. Estruturas das Julichromes encontradas na fração 7 da linhagem CCMA 33.....	80
Figura 29. Espectro de MS/MS do íon de m/z 719, confirmando a presença da Julichrome Q ₆ , na fração ativa	81
Figura 30. (A) Perfis de fragmentação dos íons m/z 260 presentes na fração 8 da linhagem CCMA 33. (B) Perfis de fragmentação dos íons m/z 312 presentes na fração 8 da linhagem CCMA 33	82
Figura 31. Estrutura química da Caerulomicina (C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₃), possível composto presente na fração ativa	83
Figura 32. Estrutura química da Staurosporinona (C ₂₀ H ₁₃ N ₃ O), possível composto presente na fração ativa.....	83
Figura 33. Espectro de RMN de ¹ H da subfração 16 dissolvida em D ₂ O.....	85
Figura 34. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da subfração 16 dissolvida em D ₂ O.....	85
Figura 35. Espectro de HSQC da subfração bioativa 16 da actinobactéria CCMA 33, solubilizada e D ₂ O.	86
Figura 36. Espectro de gHMBC da subfração bioativa 16 da actinobactéria CCMA 33 solubilizada e D ₂ O.	87
Figura 37. Espectros de nanospray (nanomate), no modo positivo, dos extratos brutos das actinobactérias CCAL 10, CCMA 02, CCMA 44, CCAL 39, CCMA 33 e CCMA 30, respectivamente	90
Figura 38. Efeito de duas linhagens de actinobactérias e seus metabólitos no controle de <i>Pythium aphanidermatum</i> em plântulas de pepino, cultivar Safira. Mesmas letras não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). Coeficiente de variação de 33,02%	92
Figura 39. (A) Plântulas de pepino sem tratamento e sem a presença do <i>Pythium aphanidermatum</i> , 100% de plântulas sadias - Testemunha negativa (1ºtratamento), (B) Plântulas de pepino sem o tratamento e com a presença do <i>Pythium aphanidermatum</i> , 100% de plântulas mortas – testemunha negativa (2º tratamento)	92
Figura 40. (A) Plântulas de pepino com 86% de plântulas sadias – 8º Tratamento (suspensão da linhagem CCMA 30), (B) Plântulas de pepino com 26% de plântulas sadias – 9º Tratamento (suspensão da linhagem CCMA 33)	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16s rRNA.....	38
Tabela 2. Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores de reação que foram utilizados para amplificação de seqüências conservadas de NRPS e PKS.....	39
Tabela 3. Atividade antagonica dos isolados de actinobactérias rizosféricas de milho contra alguns patógenos.....	50
Tabela 4. Características morfológicas dos isolados CCMA 30 e CCMA 33.....	52
Tabela 5. Identificação das actinobactérias selecionadas pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA, depositadas como linhagem Tipo no banco de dados RDP	54
Tabela 6. Ação inibitória de extratos de diferentes linhagens contra <i>Pythium aphanidermatum</i>	63
Tabela 7. Rfs das frações dos extratos visualizadas sob lâmpada UV com dois comprimentos de onda 254/366 nm.....	64
Tabela 8. Resultados dos testes de bioautografia com os extratos CCMA 30 e CCMA 33 que apresentaram atividade antifúngica.	65
Tabela 9. Avaliação da atividade biológica de frações frente ao <i>Pythium aphanidermatum</i>	68
Tabela 10. Gradiente das fases móveis (acetonitrila e água) utilizadas no desenvolvimento do método cromatográfico (HPLC).....	72
Tabela 11. Buscas por compostos produzidos por <i>Streptomyces griseorubiginosus</i> existentes na literatura	78
Tabela 12. Resultado das buscas pelas Julichromes já caracterizadas na literatura	80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 <i>Microrganismos Rizosféricos: a rizosfera e sua importância</i>	18
2.2 <i>Características gerais das actinobactérias</i>	18
2.3 <i>Identificação de actinobactérias</i>	20
2.4 <i>Actinobactérias como agentes de Biocontrole</i>	22
2.5 <i>Metabólitos secundários produzidos por actinobactérias- importância na agricultura</i> . 24	
2.6 <i>A diversidade Funcional e Química dos Metabólitos Secundários ou Peptídeos</i>	26
2.7 <i>Biossíntese de peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS)</i>	28
2.8 <i>Biossíntese de policetídeo sintase (PKS)</i>	29
3 OBJETIVOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 <i>Locais de Coleta</i>	33
4.2 <i>Isolamento de Actinobactérias Rizosféricas</i>	34
4.3 <i>Avaliação do potencial de actinobactérias antagônicas aos fitopatógenos</i>	34
4.4 <i>Métodos de identificação dos isolados de actinobactérias</i>	34
4.4.1 <i>Identificação e caracterização dos isolados de actinobactérias selecionadas</i>	34
4.4.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura dos isolados selecionados</i>	35
4.4.3 <i>Identificação da espécie de actinobactérias pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME- Fatty Acid Methyl Ester)</i>	35
4.4.4 <i>Identificação das espécies de actinobactérias utilizando-se do seqüenciamento do gene 16S rRNA</i>	36

4.4.4.1 Amplificação do gene que codifica o 16S rRNA.....	36
4.4.4.2 Purificação do DNA	37
4.4.4.3 Seqüenciamento do gene 16S rRNA.....	37
4.4.4.4 Análise filogenética das seqüências de 16S rDNA	38
4.5 Avaliação do potencial de actinobactérias que codificam para os genes NRPS e PKS	39
4.6 Curva de Crescimento e curva de produção de metabólitos secundários	40
4.7 Obtenção de metabólitos secundários.....	40
4.8 Avaliação da atividade biológica de extratos orgânicos	41
4.9 Análise de extratos orgânicos das actinobactérias	41
4.9.1 Determinação de compostos presentes nos extratos orgânicos das linhagens CCMA 30 e CCMA 33 por Cromatografia em Camada delgada.....	41
4.9.2 Bioautografia	41
4.9.3 Determinação de compostos presentes nos extratos orgânicos por cromatografia em coluna	42
4.9.4 Análises por Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE-UV)	42
4.10 Quantificação da atividade antimicrobiana (Concentração Mínima Inibitória)	43
4.11 Análise de extratos orgânicos por espectrometria de massas	44
4.11.1 Perfil Químico dos metabólitos presentes nos extratos.....	44
4.12 Derreplicação dos Extratos das Actinobactérias	44
4.13 Análise dos compostos químicos por Ressonância Magnética Nuclear.....	45
4.14 Controle Biológico de <i>P. aphanidermatum</i> em pepino sob condições controladas, de casa-de-vegetação.....	45
4.14.1 Preparo do sobrenadante de cultura.....	45
4.14.2 Separação das macromoléculas por diálise	46

4.15 Controle biológico de <i>Pythium aphanidermatum</i>	46
5 RESULTADOS	48
5.1 Isolamento e Coleta de actinobactérias	48
5.2 Triagem para seleção de linhagens produtoras de antibióticos	48
5.3 Identificação das actinobactérias selecionadas	51
5.3.1 Análise morfológica dos isolados	51
5.3.2 Métodos de identificação utilizando o seqüenciamento do gene 16s rRNA e o perfil de ácidos graxos (FAME)	53
5.4 Genes que codificam para NRPS e PKS.....	57
5.5 Curva de crescimento e de produção de antibióticos	59
5.6 Extração de metabólitos secundários	61
5.7 Estudos dos metabólitos secundários produzidos por <i>Streptomyces griseorubiginosus</i> CCMA 30 e <i>Streptomyces griseorubiginosus</i> CCMA 33	63
5.7.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	63
5.7.2 Bioautografia	64
5.7.3 Cromatografia em Coluna.....	66
5.8 Concentração Mínima inibitória das linhagens de <i>Streptomyces griseorubiginosus</i> CCMA 30 e CCMA 33.....	66
5.9 Perfil Químico dos extratos brutos das linhagens CCMA 30 e CCMA 33.....	69
5.9.1 Fracionamento do extrato bruto CCMA 30 e CCMA 33 e identificação da fração ativa	73
5.9.2 Derreplicação dos Extratos das Actinobactérias	77
5.9.3 Subfração ativa analisada por RMN (Ressonância Magnética Nuclear).....	84
5.10 Estudos de quimiotaxonomia	88
5.11 Controle biológico de <i>Pythium aphanidermatum</i>	91

6 CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1 INTRODUÇÃO

O milho como qualquer outra planta, pode ser considerado um microecossistema complexo que abriga diferentes nichos, que são explorados por uma extensa variedade de microrganismos, como, por exemplo, as actinobactérias que 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). Esses microrganismos colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos e podem ser importantes candidatos para o controle destes.

Os possíveis benefícios que as actinobactérias podem representar na produtividade e, principalmente, na produção de enzimas, na fixação biológica do nitrogênio, controle biológico, na produção de agentes anticancerígenos, como vetores de genes de resistência, degradação de compostos (alcalóides), traz à tona a necessidade do isolamento e identificação desses microrganismos, para estudos fisiológico/morfológico, e da diversidade de espécies.

Muitos dos compostos isolados de actinobactérias possuem aminoácidos proteinogênicos e não proteinogênicos assim como funcionalidade derivada de policetídeos, o que mostra que suas prováveis biossínteses envolvem as enzimas multifuncionais sintetase de peptídeos não-ribossômicos (NRPSs) e sintases de policetídeos (PKSs). As NRPSs estão envolvidas na produção de importantes antibióticos tais como as penicilinas, vancomicinas e ciclosporinas. Os PKSs modulares, os quais estão proximamente relacionados com os NRPSs, são descritos na biossíntese de antibióticos produzidos pelas actinobactérias (eritromicinas).

Consequentemente é possível deduzir a composição dos peptídeos pela análise das seqüências dos genes de NRPS e/ou PKS. Dessa forma, várias estratégias foram descritas para amplificação de fragmentos de genes de NRPSs e PKS usando oligonucleotídeos degenerados iniciadores de PCR. A aplicação dessa abordagem molecular aumentou significativamente a chance de identificar metabólitos novos cuja produção é dependente de genes correspondentes.

Para a identificação de compostos antifúngicos diversas metodologias cromatográficas e de espectrometria de massas foram realizadas. Após a obtenção do perfil químico das frações bioativas presentes nos extratos, buscas na literatura e em bancos de dados revelaram a existência de uma série homóloga composta por bisantraquinonas caracterizadas de Julichrome Q₆₋₆ 10`dihidroxi (C₃₈H₃₈O₁₄), Julichrome Q₁₋₃ (C₃₈H₃₆O₁₅) e Julichrome Q₃₋₃ (C₃₈H₃₈O₁₆), substâncias sintetizadas por policetídeos.

Neste trabalho foi avaliado o potencial biotecnológico dessas actinobactérias rizosféricas de plantas de milho na produção de metabólitos secundários, no controle biológico de fitopatógenos e, também, na identificação de substâncias bioativas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microrganismos Rizosféricos: a rizosfera e sua importância

Do ponto de vista nutricional, o solo sem cobertura vegetal é um grande deserto para os microrganismos heterotróficos. É nas imediações das raízes (rizosfera) que eles encontram os substratos que necessitam para sua proliferação. Conseqüentemente, vários processos importantes do solo influenciam a produção e a qualidade ambiental, dentre eles a decomposição da matéria orgânica e as interações microbiológicas são maximizadas na rizosfera. A diversificação de espécies favorece a cobertura eficiente do solo, a exploração de volume de solo reduz o "estreitamento genético", contribuindo para maior diversidade e atividade de microrganismos (CATTELAN e VIDOR, 1990).

A perda da cobertura do solo provocada por erosão, desmatamento ou práticas agrícolas, causa elevação na temperatura do solo e interfere nos processos biológicos, observando-se decréscimos nas populações de bactérias, fungos, actinobactérias e solubilizadores de fosfato, enquanto a proporção de endósporos de bactérias aumenta, refletindo as condições adversas ao desenvolvimento microbiano (CATTELAN e VIDOR, 1990).

Os estresses naturais ou causados pelo homem no solo podem provocar mudanças na composição de espécies microbianas, na sucessão de espécies simbiotes e nos atributos morfológicos e fisiológicos das associações simbióticas. A ausência de cobertura vegetal acarreta uma redução na quantidade de matéria orgânica depositada sobre o solo e de nutrientes nos micro-habitats dos microrganismos; provoca também variações na temperatura e umidade do solo o que faz com que haja uma alteração tanto quantitativa quanto qualitativa na população microbiana em geral (SIQUEIRA, 1994).

2.2 Características gerais das actinobactérias

Actinobactérias são bactérias Gram positivas cuja morfologia é variada de acordo com o gênero. Podem ser esféricas ou bacilares e formam filamentos, hifas, que compõem um micélio de coloração variada (FLÄRDH e BUTTNER, 2009).

O micélio consiste de células procarióticas longas com vários nucleóides (EMBLEY e STACKEBRABDT, 1994). O micélio é uma vantagem para o microrganismo, pois ele tem a

capacidade de aderir ou penetrar em tecidos e ajudam a secretar enzimas e outros metabólitos. Com a aproximação do micélio aos substratos, o microrganismo precisa secretar apenas uma quantidade pequena de enzima para atingir níveis efetivos (CHATER, 2006).

Algumas espécies de actinobactérias podem se reproduzir por fragmentação das hifas, como o gênero *Nocardia*, por exemplo; em outras actinobactérias a reprodução é feita através de esporos assexuais do tipo conidiósporos ou esporangiósporos. Os esporos podem ser móveis (o que é raro) ou não e, normalmente, são formados quando há escassez de nutrientes (FLÄRDH e BUTTNER, 2009).

Eles não são muito resistentes ao calor, porém resistem bem à dessecação, tendo assim um grande valor na preservação da espécie (EMBLEY e STACKEBRANDT, 1994). As actinobactérias são encontradas em muitos habitats. No solo, são numericamente menos dominantes do que outras populações bacterianas, porém são mais numerosos do que as populações fúngicas. Normalmente, 10 a 50% da comunidade microbiana do solo é constituída por populações destes microrganismos.

Representantes do subgrupo dos estreptomicetos são muito comuns no solo. Entre estes, encontram-se o *Streptomyces griseus* e o *Streptomyces aureofaciens*. Os representantes do gênero *Streptomyces* produzem importantes antibióticos, como a estreptomicina, sintetizada por *S. griseus*, a clorotetraciclina, sintetizada por *S. aureofaciens*, a terramicina, sintetizada por *S. rimosus*, entre muitos outros. Mais de oitenta antibióticos já foram obtidos de espécies do gênero *Streptomyces*. Os representantes do gênero *Frankia* vivem em simbiose com as raízes de plantas superiores (por exemplo, da casuarina, *Casuarina* sp.), onde levam à formação de nódulos, no interior dos quais ocorre fixação de nitrogênio (CHATER, 2006).

A classe das actinobactérias possui alto conteúdo de guanina e citosina (G+C) em seu DNA; são geralmente aeróbicos ou microaerófilos, mas também se encontram espécies anaeróbicas (CROSS, 1989; GOODFELLOW, 1989; EMBLEY e STACKEBRANDT, 1994). As actinobactérias são encontradas, sobretudo no solo, estima-se que em cada grama de solo contém 10^6 – 10^9 células destas bactérias. No entanto, elas podem estar presentes nos mais diversos ambientes, como águas, plantas e, até mesmo, em associação com líquens (GONZÁLEZ et al., 2005). Essas bactérias são muito versáteis metabolicamente, o que possibilita a utilização de muitas fontes diferentes de carbono; podem ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou fototróficos. Algumas poucas espécies são patogênicas ao homem, animais ou plantas.

A grande importância das actinobactérias no ambiente é o seu papel na degradação de matéria orgânica; possuem atividade proteolítica, função na decomposição de queratinas, quitinas, celuloses, amido e, também, no ciclo de aminoácidos e nitrogênio (CHATER, 2006; KENNEDY, 1999).

O gênero *Streptomyces*, é o mais predominante na natureza (70-90% das colônias desenvolvidas em meio de cultura sólido), *Nocardia*, usualmente é o segundo gênero mais abundante (5-30%), seguido do gênero *Micromonospora*, que ocorrem em frequências que variam de 1 a 15%. A predominância destes microrganismos no solo só é significativa quando os compostos prontamente disponíveis são metabolizados anteriormente, quando os nutrientes começam a ser limitantes e a pressão dos competidores mais efetivos diminui. Desta forma, degradam substâncias normalmente não decompostas pelas populações de fungos e outras bactérias, como celulose, hemiceluloses, fenóis, quitina, queratina, ligninas e húmus (KENNEDY, 1999).

Na pesquisa, a característica mais marcante do grupo é a capacidade de produzir metabólitos secundários, úteis na indústria farmacêutica e outras, despertando o interesse de biotecnologistas, geneticistas e ecologistas. As actinobactérias sintetizam vários tipos de enzimas, vitaminas e antibióticos (CHATER, 2006; KENNEDY, 1999). Seguramente, a produção de antibióticos é a característica mais estudada e mais importante das actinobactérias, especialmente no gênero *Streptomyces*, o qual produz a maioria dos antibióticos utilizados em humanos, na veterinária e na agricultura, sendo que na clínica médica eles representam cerca de 80% (CHATER, 2006; FGUIRA et al., 2005). Outro fator muito interessante é que este único gênero produz inúmeros compostos não relacionados. Dentre os antibióticos, pode-se citar os aminoglicosídeos, macrolídeos, ansamicinas, cefalosporinas, poliênicos, e outros.

2.3 Identificação de actinobactérias

Na identificação das actinobactérias é importante levar em consideração diferentes características desses organismos, o que implica na utilização de várias técnicas diferentes para esse fim. Em relação à morfologia deve-se observar a cor do micélio e o tipo de esporo, quando presente. Para tanto é importante utilizar um meio de cultura que possibilite uma boa esporulação e a diferenciação do micélio (LECHEVALIER, 1989).

Outros fatores que podem diferenciar algumas actinobactérias são a composição da parede celular e o perfil de ácidos graxos (STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997). A composição da parede celular varia consideravelmente entre os diversos grupos de actinobactérias. Pode-se diferenciar alguns grupos de paredes celulares baseando-se em dois aspectos principais: o aminoácido dibásico presente na parede, e a presença de açúcares característicos. Todos os tipos de parede celular contêm alanina, ácido glutâmico, glucosamina e ácido murâmico, mas apresentam algumas diferenças. As paredes do Tipo I possuem o isômero L do ácido diaminopimélico (DAP) e glicina; o Tipo II possui o isômero meso do ácido diaminopimélico e glicina; Tipo III possui meso-DAP; Tipo IV meso-DAP, arabinose e galactose; Tipo V possui lisina e ornitina; Tipo VI apresenta presença variável de ácido aspártico e galactose; Tipo VII possui ácido diaminobutírico e glicina, com lisina variável; e o Tipo VIII apresenta ornitina. As actinobactérias que possuem meso-DAP na sua parede apresentam os seguintes padrões de açúcares: A, arabinose e galactose; B, madurose; C, sem açúcar característico; D, arabinose e xilose (LECHEVALIER, 1989).

O grupo dos streptomycetos é um tanto diferenciado porque apresenta uma parede celular caracterizada como Tipo I, com presença de ácido L-diaminopimélico e glicina, mas ausência de açúcares característicos, assim como o gênero *Nocardioides*, enquanto os demais gêneros possuem o isômero meso-DAP (ANDERSON e WELLINGTON, 2001). O perfil de ácidos graxos baseia-se na capacidade das bactérias em sintetizar diferentes ácidos graxos. Para essa análise os ácidos graxos são extraídos e a composição dos metil ésteres dos ácidos graxos resultantes é feita por cromatografia gasosa (CHUN et al., 1997). As actinobactérias com parede celular do Tipo IV apresentam ácidos graxos α ramificados β hidroxilados, chamados ácidos micólicos, especialmente importantes na identificação do gênero *Nocardia* (LECHEVALIER; HORAN; LECHEVALIER, 1971). Também se pode fazer uma caracterização bioquímica, nutricional e fisiológica, realizando-se provas como as de utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, resistência a antibióticos, testes de degradação como a de adenina, tirosina, xantina, queratina, caseína; testes de crescimento, que envolvem tolerância à temperatura, pH e inibidores químicos; e testes bioquímicos, como catalase e proteólise (WILLIAMS et al., 1983).

Tanto as provas bioquímicas, como a determinação da composição da parede celular e o perfil de ácidos graxos são métodos laboriosos e que demandam tempo para a obtenção dos resultados. Além disso, a caracterização bioquímica apresenta certa variabilidade em seus resultados.

Portanto, devido à dificuldade de cultivo de algumas espécies e ao advento da biologia molecular, com acesso cada vez mais fácil e com a rapidez na obtenção dos resultados, os métodos moleculares têm sido o de maior preferência na identificação das actinobactérias. Dentre esses métodos, o mais utilizado é o seqüenciamento da subunidade 16S rRNA. Através de uma reação em cadeia de polimerase (PCR – polimerase chain reaction) amplificam-se regiões que codificam para o 16S rRNA utilizando primers homólogos a regiões conservadas do gene. Essas regiões são seqüenciadas e comparadas com seqüências previamente catalogadas (EMBLEY e STACKEBRANDT, 1994; HEUER et al., 1997).

Um estudo com actinobactérias isoladas de líquens feito por González e colaboradores (2005), utilizou métodos variados para identificar o isolado. Eles fizeram observação direta do micélio vegetativo e do micélio aéreo, caracterizaram os ácidos graxos presentes, extraíram o DNA, e ainda utilizaram outras técnicas de identificação por RNA. Através da análise da composição de ácidos graxos, eles puderam confirmar a maioria dos gêneros identificados pela morfologia, no entanto, a análise molecular foi capaz de obter informações mais aprofundadas quanto à diversidade em nível de linhagem. Outros autores procuram identificar o gênero dos isolados pela observação direta do micélio em conjunto com a técnica de 16S rRNA PCR.

2.4 Actinobactérias como agentes de biocontrole

Na área agrícola, alguns metabólitos secundários produzidos por actinobactérias têm sido comercializados como fungicidas.

O potencial dos estreptomicetos para produção de pesticidas é evidenciado pelas avermectinas, um grupo de metabólitos produzidos por *S. avermitilis*. Estes metabólitos e seus derivados semi-sintéticos são ativos contra certos nematóides em doses extremamente baixas, apresentando, portanto, baixa toxicidade em mamíferos (HEISEY et al. 1991). A espécie *Streptomyces lavendulae* identificada no trabalho de Costa (2005) como sendo endofítica de milho, é conhecida como produtora de mitomicina C (MC), um potente agente também anticancerígeno (MARTIN et al., 2002) e, produtora de pigmento azul (HASHIMOTO et al., 1992; WAKI; NIHIRA; YAMADA, 1997).

Muntanola e colaboradores (2000), verificaram a atividade fungistática de *Streptomyces albidoflavus* contra *Diaporthe* sp. e *Phomopsis* sp., microrganismos causadores de podridões em sementes. A espécie é também produtora de proteases (KANG et al., 1995),

que pode ser utilizada na indústria alimentícia e química (SAID e PIETRO, 2002) e, quitinases (DONZELLI; OSTROFF; HARMANA, 2003), controlando por ingestão insetos herbívoros (BROADWAY et al., 1998).

O uso de actinobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas vem sendo estudado desde 1914. Embora os trabalhos existentes sejam em número reduzido, os resultados são promissores, como aqueles em que o uso de *Streptomyces* sp. controlou, em nível satisfatório, a murcha incitada por *R. solanacearum* em batata-doce (GAO, LIN E FANG, 1983), em tomate (EL-ABYAD et al., 1993a) e em banana (EL-ABYAD et al., 1993b).

Segundo pesquisas realizadas por Cecília et al. (2004), o fitopatógeno *Pythium aphanidermatum*, causador de podridão de raízes em inúmeras espécies de plantas, traz sérios prejuízos para a cultura de pepino no Brasil. Uma saída ao uso excessivo de fungicidas é o controle biológico desse patógeno utilizando bactérias e actinobactérias endofíticas. Testes de antagonismo *in vitro* foram previamente realizados, a fim de selecionar linhagens produtoras de antibiótico inibidor desse patógeno. Oito rizobactérias e três actinobactérias obtiveram ótimos resultados e foram selecionados para testes em casa de vegetação. Os resultados demonstraram que todas as actinobactérias (*Streptomyces* spp.) reduziram o ataque causado por *P. aphanidermatum* sobressaindo-se à linhagem 16R3B com 72% de controle da doença. Comparando os resultados da actinobactéria 16R3B com os resultados das linhagens de rizobactérias, as quais controlaram apenas 26% da doença, pode-se concluir que a linhagem de actinobactéria testada apresenta um eficiente mecanismo de ação para controlar o fitopatógeno, possivelmente um metabólito secundário, característica importante deste grupo de microrganismos.

Em condições tropicais, a murcha-bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, tem provocado danos severos à cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), principalmente em condições de temperaturas acima de 25 °C, com umidade relativa elevada. Neste contexto, o controle biológico pode representar uma alternativa viável. Autores selecionaram isolados de actinobactérias para o controle de *R. solanacearum* em tomateiro. Entre os isolados avaliados verificaram-se diferenças na inibição do patógeno *in vitro*, tanto em relação à faixa de pH avaliada, quanto ao tempo de observação. Constataram-se, também, variações no estabelecimento dos isolados de actinobactérias na rizosfera das plântulas e nas mudas preparadas para transplante, e os isolados SP164, SF232, SAc326 e SG384 apresentaram as densidades populacionais mais elevadas. O experimento conduzido em canteiros com solo infestado com *R. solanacearum* mostrou que as plantas tratadas com o

isolado SG384 apresentaram melhor nível de controle, 48 dias após a semeadura, período no qual todas as testemunhas haviam morrido (GAVA; PEREIRA; FERNANDES, 2002).

O uso de actinobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas vem sendo estudado desde 1914. Embora os trabalhos existentes sejam em número reduzido, os resultados são promissores, como aqueles em que o uso de *Streptomyces* sp. controlou, em nível satisfatório, a murcha incitada por *R. solanacearum* em batata-doce (GAO, LIN E FANG, 1983), em tomate (EL-ABYAD et al., 1993a) e em banana (EL-ABYAD et al., 1993b).

2.5 Metabólitos secundários produzidos por actinobactérias- importância na agricultura

Os metabólitos secundários são compostos não essenciais para o crescimento e reprodução dos diferentes organismos vivos, sendo derivados dos metabólitos primários. Entre estes compostos encontram-se antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de resposta imunológica, agentes antitumorais, ferormônios e promotores de crescimento de animais e plantas (DEMAIN, 1992).

Todos os organismos vivos crescem e se reproduzem utilizando rotas metabólicas muito semelhantes, ou até idênticas, para a geração de energia. Essas reações fazem parte do metabolismo primário. A grande diversidade entre os organismos é decorrente da maneira como cada um organiza algumas poucas unidades monoméricas em grandes macromoléculas. No entanto, existem outras rotas metabólicas que possibilitam os organismos a produzirem os mais diversos tipos de compostos, alguns inclusive restritos a certos gêneros ou espécies. Essas rotas constituem o metabolismo secundário, que pode ocorrer na fase estacionária do microrganismo durante o crescimento (VINING, 1986).

Segundo Luckner (Secondary Metabolism in Plants and Animals, 1972), o metabolismo secundário é constituído por uma infinidade de substâncias que em geral são consideradas produtos de excreção, fonte de energia ou produtos de estocagem sem qualquer importância para os organismos que as produzem.

Segundo Martin, Liras e Demain (in The Filamentous Fungi, 1978, vol. III), no caso de microrganismos, metabólitos secundários são os produtos do metabolismo que são quase sempre produzidos após a fase de crescimento, não apresentando função durante o crescimento, embora possam apresentar função essencial para a sobrevivência da linhagem (ex., antibióticos). São produzidos por grupos específicos de microrganismos, apresentam

estruturas químicas pouco usuais, e quase sempre ocorrem na forma de misturas de compostos muito semelhantes.

Segundo Geissman e Crout (Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism, 1969), substâncias do metabolismo secundário são de natureza relativamente complexa e distribuição restrita, ao contrário das substâncias do metabolismo primário que apresentam uma distribuição universal. Poucos produtos naturais possuem uma função característica bem determinada no metabolismo dos organismos que as produzem. Contudo, também não podem ser considerados como “lixo metabólico”, “anomalias funcionais”, ou ainda produtos finais de degradação do metabolismo primário.

A produção de metabólitos secundários está distribuída dentre os mais variados reinos. As plantas produzem inúmeros metabólitos secundários com variadas funções, como proteção a predadores e pigmentos importantes para reprodução. Insetos produzem metabólitos para comunicação ou proteção; e ainda dentre os eucariotos, os fungos são grandes produtores de metabólitos secundários como diversos tipos de enzimas e até mesmo antibióticos. Dentre as bactérias, o destaque fica para as actinobactérias, que assim como os fungos sintetizam enzimas e a maioria dos antibióticos conhecidos (VINING, 1986).

A produção de metabólitos secundários por microrganismos encontra ampla aplicação na área de fármacos e agroquímicos (ROBINSON, 1988). Entre as bactérias, a ordem Actinomycetales é a única fonte de compostos bioativos comercialmente importante (ARAÚJO, 1998). Membros desta ordem, as actinobactérias, são reconhecidos como os principais produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais são antibióticos úteis como antitumorais, antihelmínticos, antifúngicos, herbicidas ou agentes farmacologicamente ativos (ARAÚJO, 2002). Nos últimos anos, mais de 6000 antibióticos foram descobertos, e desses, 65% são produzidos pelo gênero *Streptomyces* (ARAÚJO, 1998).

As actinobactérias apresentam forte antibiose contra diferentes microrganismos e, conseqüentemente, apresentam grande capacidade de competição por nutrientes, por nichos e por colonizarem a rizosfera (MILLER; HENKEN; VAN VEEN, 1989) e os tecidos internos do hospedeiro (SARDI et al., 1992). Estas características fazem com que estes microrganismos apresentem um grande potencial para o controle biológico de fitopatógenos. Actinobactérias também são parasitas de oósporos e escleródios (SUTHERLAND; PAPAVIDAS, 1991; ZUBERER; KENERLEY; EGER, 1988). Yuan e Crawford (2002), observaram que *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* tiveram seus crescimentos inibidos quando colocados para crescer em meio líquido contendo *Streptomyces lydicus*. Inserir no texto de actinobactérias

Compostos originados do metabolismo secundário possuem estrutura muito diversificada, sendo algumas vezes difícil de classificá-los. Mesmo assim, procura-se fazer essa classificação baseada em seu precursor, que sempre é fornecido pelo metabolismo primário. Então podemos classificar os metabólitos secundários em:

- Sacarídeos - cujo principal precursor é a glicose. Dentre os sacarídeos encontramos a Estreptomina, produzida pelo *Streptomyces griseus*;
- Peptídeos - como o nome já diz, são provenientes de aminoácidos. Um exemplo é a Penicilina G, sintetizada por *Penicillium chrysogenum*.
- Acilogeninas - provenientes de precursores acil ativados. Neste grupo podemos citar a Tetraciclina, de *Streptomyces aureofaciens* e a Geosmina, comum entre actinobactérias.
- Nucleosídeos - sintetizados a partir de ácidos nucléicos. A Cafeína é um representante deste grupo; ela é produzida por espécies de *Coffea*.
- Diversos - nesta categoria são colocados os compostos cujas estruturas não se encaixam em nenhuma das outras categorias, por exemplo, glicopeptídeos, entre os quais está a Vancomicina, originada de *Streptomyces orientalis* (VINING, 1986).

Portanto, quando há interesse em produzir algum metabólito secundário, é necessário estudar cada espécie em particular, pois uma mudança nas condições de cultivo pode inibir a produção ou ainda levar a produção de outros compostos que não o esperado.

2.6 A diversidade funcional e química dos metabólitos secundários ou peptídeos

Os peptídeos foram divididos em vários grupos baseados em sua massa molecular, estrutura secundária e terciária e presença ou ausência de pontes de dissulfeto (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004). Os peptídeos são biomoléculas que contém de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas. Se comparados às proteínas, são quimicamente mais versáteis, pois podem ser esterificados em suas carboxilas terminais, acetilados em seus grupos amino terminais, fosforilados ou sulfatados em um ou mais resíduos (serina, treonina ou tirosina), lineares, semi-cíclicos (geralmente via uma ou mais ligações dissulfeto intra - ou intercadeias peptídicas) ou cíclicos (via ligação entre os grupos amino e carboxila dos aminoácidos terminais). Muitos contêm um ácido piroglutâmico como resíduo N-terminal, outros apresentam D-aminoácidos e outros, ainda, possuem aminoácidos não usuais (GUTTE, 2000). Os peptídeos são também extremamente diversificados em termos funcionais. Muitos atuam como hormônios ou fatores liberadores

destes, enquanto outros são neuropeptídeos, neurotransmissores, toxinas ou antibióticos naturais (KO et al., 2002; MIRANDA, 2000). Os peptídeos são divididos em duas classes (HANCOCK; CHAPPLE, 1999):

a) Peptídeos sintetizados pela via ribossomal: são produzidos por todas as espécies de vida, incluindo as bactérias, como o componente principal do sistema de defesa do hospedeiro. Na síntese ribossômica de peptídeos, a formação das pontes peptídicas é direcionada pelos ribossomos e o RNAm funciona como molde determinando a seqüência do aminoácido do produto. O número de aminoácidos incorporados naturalmente nos peptídeos ribossômicos está restrito a 20, codificados pelos códons de RNAm. Os quais podem consistir de mais de 3000 resíduos de aminoácidos.

b) Peptídeos sintetizados pela via não-ribossomal: são drasticamente modificados e amplamente produzidos por bactérias. São exemplos os glicopeptídeos como a vancomicina. A síntese não-ribossômica utiliza uma grande variedade de substratos, como aminoácidos não-protéicos, hidroxíácidos e substâncias policetídicas, especialmente elaboradas para serem incorporadas na estrutura destes peptídeos.

Mais de 300 precursores diretos são conhecidos. No processo biossintético eles podem ser modificados de várias maneiras pelos domínios integrados ou pelas funções codificadas por genes separados, o que propicia uma diversidade enorme de peptídeos lineares ou cíclicos.

O tamanho desses peptídeos varia de 2 a 48 aminoácidos (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996). Peptídeos não-ribossômicos freqüentemente contêm aminoácidos não usuais, incluindo aminoácidos não protéicos ou modificados. A habilidade destes complexos multienzimáticos de incluir tais aminoácidos e incorporá-los em ambos os peptídeos cíclicos e lineares resulta numa grande estrutura natural diversa das espécies bacterianas e fúngicas.

Os peptídeos não ribossômicos podem também atuar como um esqueleto para a biossíntese de estruturas mais complexas ou podem ser incorporados como ácidos graxos ou policetonas. Tais estruturas podem ser biossintetizadas por sistemas de peptídeos sintetase mistos ou híbridos e policetídeo sintase. O número de metabólitos secundários estruturalmente identificados produzidos por este mecanismo de arranjo de tióis foi rapidamente se expandindo (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996).

2.7 Biossíntese de peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS)

As moléculas sintetizadas pelas NRPSs normalmente são cíclicas com uma grande quantidade de aminoácidos não proteínogênicos e frequentemente contêm aminoácidos conectados por ligações diferentes das peptídicas, como as ligações di-sulfídicas (CHALLIS; NAISMITH, 2004).

A biossíntese desta via ocorre através de uma série de reações enzimáticas parciais e repetitivas, os aminoácidos que constituem a estrutura do peptídeo são incorporados sequencialmente, onde a formação dos peptídeos não ribossômicos está ligada diretamente ao módulo que corresponde ao segmento de DNA que codifica o sistema multienzimático. A seqüência de eventos é determinada por um arranjo espacial de domínios catalíticos com os módulos em NRPS envolvidos na catálise de reações parciais. A enzima utiliza um módulo composto por cerca de 1.000 aminoácidos, para a incorporação de um aminoácido em um peptídeo não-ribossômico sendo subdividido em regiões menores, envolvidas em reações enzimáticas específicas. Ocorre uma relação linear entre as etapas de biossíntese e a seqüência de módulos. O primeiro módulo de uma NRPS está envolvido na incorporação e ativação do aminoácido N- terminal e os demais módulos na incorporação dos aminoácidos subseqüentes. As mínimas reações de NRPS são condensações, adenilação e tioesterificação (ETCHEGARAY, 1998; MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; VON DÖHREN et al.,1997).

As regiões envolvidas nestas reações parciais estão localizadas em domínios, ou seja, de adenilação (domínio A), de formação de tioésteres (domínio P) e de condensação (domínio C). Em analogia a biossíntese de ácidos graxos, onde se tem a proteína carreadora de acilas (ACP) (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997) o domínio de formação de tioésteres também é conhecido como proteína carreadora de peptídeos (PCP). Vários outros domínios já foram descritos embora não sejam essenciais para a incorporação de aminoácidos. Ao fim da síntese enzimática de peptídeos o produto é liberado da enzima por meio da atividade de tioesterase, geralmente catalisada pelo domínio de tioesterase (T). O domínio T está frequentemente inserido no último módulo das NRPSs (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). Para os peptídeos sintetases se tornarem funcionais elas necessitam sofrer modificação, ocorrendo à incorporação do cofator 4'-fosfopantoteína (PAN) ao domínio PCP através de uma ligação covalente do tipo fosfodiéster ao resíduo de serina (WALSH, 2004).

2.8 Biossíntese de policetídeo sintase (PKS)

Uma importante classe de metabólitos secundários são os policetídeos. Eles são produzidos por bactérias, actinobactérias, fungos, plantas e animais. São biossintetizados pela condensação de subunidades propinílicas e acetílicas, por um processo semelhante à síntese de ácidos graxos. Eles são a base para uma gama de produtos naturais e seus derivados (KEATING; WALSH, 1999).

Devido à diversidade estrutural, os policetídeos são classificados em quatro grupos principais: aromáticos, macrolídeos (termo “macrolídeo” está relacionado com a estrutura – um anel de lactona de vários membros, ao qual se ligam um ou mais desoxi-glicóis), poliéteres e polienos. Os mecanismos de biossíntese encontrados são comuns, independente do grupo pertencente (Figura 1).

Os policetídeos são biossintetizados por sistemas multi-enzimáticos chamados de policetídeo sintases (PKSs) (Figura 2). O grande número de sintases modula a arquitetura e as funções dos policetídeos, catalisando etapas de alongamento da cadeia policetídica, bem como as modificações estruturais pela adição de grupos funcionais (HUTCHINSON, 1999).

Em cada etapa do alongamento da cadeia, um monômero do grupo acila é recrutado por precursores acil-CoA. Outros precursores típicos são os acetil-CoA, propionil-CoA e outros alquil-CoAs, podendo ser utilizados como iniciadores de cadeia, e outros como malonil-CoA e metilmalonil-CoA são utilizados somente no processo de alongamento. O tamanho do policetídeo produzido é controlado pelo número de etapas repetidas (KHOSLA et al., 1999).

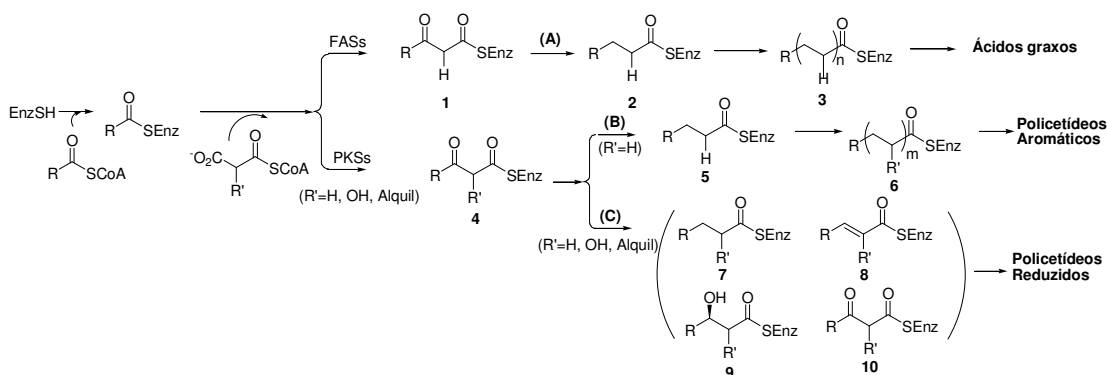


Figura 1. Síntese de ácidos graxos e policetídeos, onde FAKs são as enzimas que catalisam a biossíntese de ácidos graxos e PKSs são os complexos enzimáticos que catalisam a biossíntese de policetídeos. (A) corresponde ao caminho biossintético para ácidos graxos, (B) para policetídeos aromáticos e (C) para policetídeos reduzidos.

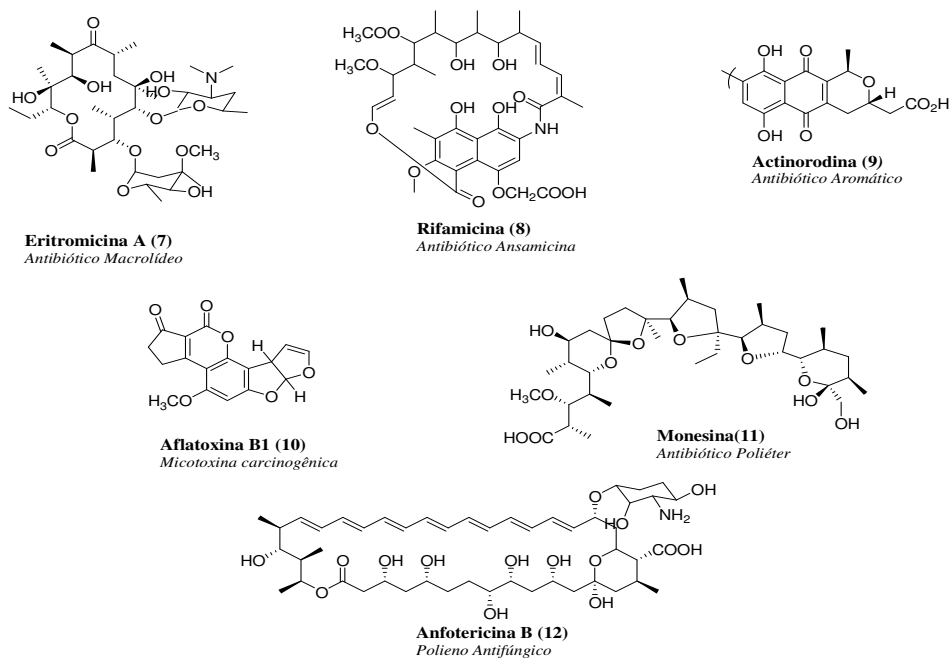


Figura 2. Alguns exemplos de Policetídeos reduzidos.

As PKSs são classificadas em dois tipos de acordo com sua arquitetura enzimática e sua organização genética. O tipo I são proteínas multifuncionais que são dominadas por atividades enzimáticas individuais e podem ser encontradas em bactérias, fungos e plantas (BODE; MULLER, 2005). O tipo II são complexos multi-enzimáticos constituídos por proteínas monofuncionais e são encontrados apenas em bactérias (JENKE-KODAMA et al., 2005). As PKSs do tipo III são simples e são tipicamente encontradas em plantas e bactérias (MOFFITT; NEILAN, 2001). A principal diferença entre NRPSs e PKS está no fato de que PKSs condensam ácidos carboxílicos a uma cadeia crescente para formar um produto e NRPSs adicionam aminoácidos

É bem estabelecido que a biossíntese de policetídeos reduzidos seja catalisada por PKSs não interativas do Tipo I, que controlam a variação estrutural do produto desenvolvendo um conjunto de possibilidades de arranjos lineares que reproduzem a sequência biossintética do metabólito. E esta é a base do mecanismo para agrupar macrolídeos, poliéteres e polienos juntos como complexos ou policetídeos reduzidos (KEATING; WALSH, 1999).

As PKSs aromáticas catalisam a biossíntese de vários poli-ciclos, principalmente aromáticos, envolvendo um intermediário linear poli- β -cetona e usando malonil-CoA

exclusivamente como unidade extensora. As principais variáveis encontradas pelos PKSs aromáticos são a unidade inicial, a determinação do número de extensões, o controle do dobramento dos intermediários lineares poli- β -cetonas e a ocorrência de reduções regioespecíficas, aromatização e ciclizações do intermediário policetídeo corretamente dobrado na produção de metabólitos policíclicos (SHEN, 2000).

Alguns policetídeos são largamente utilizados como bactericidas (eritromicina), tetraciclina e rifamicina, fungicidas (anfotericina), agentes antitumorais (doxorubicina **13**), imunossupressantes (FK 506 **14**) e rapamicina), produtos veterinários (avermectina **15**), tilosina e monensina e agroquímicos (espinosina **16**). Além disso, podem ser utilizados como anti-parasíticos, promotores de crescimento animal e inseticidas naturais de uso comercial (Figura 3).

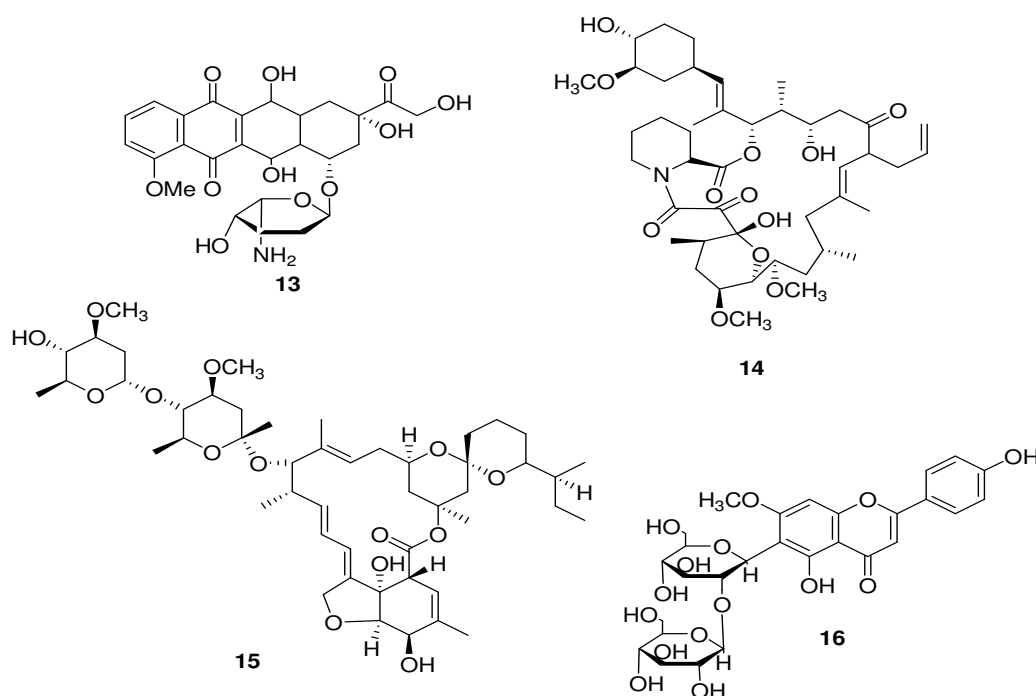


Figura 3. Policetídeos largamente empregados, que apresentam diversas atividades biológicas. Doxorubicina (13), FK 506 (14), avermectina (15), e espinosina (16).

O grande número de antraquinonas naturais é um excelente exemplo de policetídeos com estruturas acetato-derivadas. A endrocrocina foi isolada de espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo formada a partir da dobra de um policetídeo contendo oito unidades de C_2 nas periferias da cadeia carbônica (DEWICK, 1998).

3 OBJETIVOS

Determinar a diversidade de actinobactérias associadas à rizosfera de milho, avaliar e caracterizar a atividade antimicrobiana, visando a aplicação de compostos produzidos por linhagens eficientes no controle de doenças de plantas.

Objetivos Específicos:

- a) isolar, selecionar e identificar linhagens de actinobactérias da rizosfera de plantas saudáveis de milho cultivadas em diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo;
- b) identificar a presença de genes que codificam para as enzimas NRPS e PKS;
- c) obter extratos orgânicos das actinobactérias selecionadas e avaliar *in vitro* o efeito inibitório desses extratos orgânicos extraídos das actinobactérias;
- d) identificar as estruturas químicas dos compostos bioativos;
- e) avaliar, em casa de vegetação, o potencial de metabólitos secundários produzidos pelas linhagens promissoras contra *Pythium aphanidernatum*, causador de tombamento de plântulas. Nesse estudo, utilizou-se o pepino (*Cucumis sativum L.*) como planta suscetível.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de coleta

Plantas inteiras de milho sadias, coletadas em três regiões produtoras dessa cultura no Estado de São Paulo nas cidades de Socorro, Ribeirão Preto e Serra Negra, foram levadas ao laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, onde porções de 1 g. de solos rizosféricos (aquele que se manteve aderido às raízes após agitação manual) de três variedades de milho foram usadas para o isolamento de actinobactérias.

Foram amostrados solos rizosféricos de três cultivares de milho (*Zea mays* L.) e de três produtores cujas propriedades foram denominadas Sítio Santa Catarina, SAF (Sistema Agroflorestal) e Fazenda Sula.

Todas as propriedades apresentaram uma pequena área e as atividades caracterizaram-se pela agricultura familiar. Os milhos coletados das propriedades foram certificados pela certificadora AOCERT e IBD- Milho Orgânico.

Segundo os produtores, as áreas de cultivo das propriedades apresentaram as seguintes características:

- Sítio Santa Catarina (Socorro - SP): o local apresentava solo de pasto, sendo que a área de cultivo foi preparada com grande quantidade de matéria orgânica (Bocache + torta de mamona). O sistema de plantio utilizado pelo produtor foi a rotação de culturas para o cultivo de batata. A variedade do milho plantado foi AG 1051 (CATI).
- SAF - Sistema Agro-florestal (Ribeirão Preto- SP): o local apresentava solo com substrato orgânico, devido ao uso continuado de compostos orgânicos. O cultivo predominante utilizado foi de hortaliças folhosas, que vem sendo realizado há 20 anos no mesmo local. A variedade de milho plantado foi Crioulo.
- Fazenda Sula (Serra Negra-SP): O local apresentava solo adubado com bocache e esterco de vaca. O cultivo utilizado anteriormente foi de batata doce. A variedade de milho plantada foi AL 30 (CATI VERDE).

As amostragens foram feitas ao acaso, considerando 10 plantas de milho dentro da área da cultura. As raízes foram coletadas inteiras e acondicionadas em sacos plásticos, evitando-se o risco de contaminação externa. Posteriormente, foi feita a desinfestação superficial.

4.2 Isolamento de actinobactérias rizosféricas

Adicionou-se, assepticamente um grama de raiz com o solo rizosférico aderido em 9 ml de solução salina 0,85%, mantidos sob agitação (100 rpm) por 30 minutos, criando-se a suspensão de concentração 10^{-1} .

As amostras foram submetidas a uma diluição em série em solução de NaCl 0,85%. De cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-5}) foi retirado 100 μ L e semeados em placas contendo o meio de cultura amido-caseína-ágar (ACA). As culturas foram incubadas a 28 °C por até 30 dias. Após esse período colônias foram purificadas por meio de inoculação em estrias cruzadas em meio de cultivo sólido (ACA) e preservadas em glicerol 10% a – 20 ° C para realização de análises posteriores.

4.3 Avaliação do potencial de actinobactérias antagonicas aos fitopatógenos

Para avaliar o efeito das actinobactérias da rizosfera de milho sobre fungos e bactérias foi feito teste de contato direto, medindo-se o halo de inibição entre o patógeno e o microrganismo teste. Primeiramente cada actinobactéria foi inoculada a 20 mm da extremidade da placa de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) e incubada por cinco dias para permitir a sua esporulação, pois a formação dos metabólitos secundários está relacionada com a formação de hifas e esporos (CHATER; HORINOUCI, 2003; ELLIOT; TALBOT, 2004). Após este período, os seguintes organismos foram cultivados *Pythium aphanidermatum* (CCMA 243), *Fusarium moniliforme* (LMA 38), *Bacillus megaterium* (CCMA 281), *Escherichia coli* (CCMA 104), *Pseudomonas. Aeruginosa* (CCMA120), *Klebsiella* (CCMA 540) e *Staphylococcus aureus* (CCMA 190) a uma distância de 30 mm das linhagens isoladas das actinobactérias. As placas foram seladas com parafilme e incubadas em estufa a 28 °C. Os halos de inibição foram medidos com régua, após 3, 5, 7 e 10 dias.

4.4 Métodos de identificação dos isolados de actinobactérias

4.4.1 Identificação e caracterização dos isolados de actinobactérias selecionadas

Para a identificação morfológica dos isolados selecionados considerou-se como prováveis actinobactérias aqueles microrganismos que possuíam características do grupo como: esporulação, colônia pequena, ressecada e aderida ao ágar. Foi feita também a coloração de GRAM, já que uma das características do grupo das actinobactérias é ser GRAM

positiva (GOODFELLOW et al., 1998) e também por apresentarem estruturas morfológicas semelhantes aos fungos.

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura dos isolados selecionados

As linhagens selecionadas foram pré-fixadas em glutaraldeído 2% e lavadas com tampão fosfato de sódio 0,1 M três vezes por 10 minutos. Em seguida, foram fixadas com tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% por 30 minutos e lavadas, novamente com tampão fosfato de sódio 0,1 M. Após a lavagem com o tampão, foi feita desidratação em série crescente com acetona (25, 35, 50, 70, 80, 90, 100%) por 10 minutos cada concentração, exceto a última concentração que foi por 60 minutos. As amostras foram secas em ponto crítico (Emitech), metalizadas (metalizador Emitech) com ouro por 3 minutos com 30 mA e observadas em um microscópio “field emission” de varredura Gemini Leo 982 Leica Zeiss do Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente.

4.4.3 Identificação da espécie de actinobactérias pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME- Fatty Acid Methyl Ester)

As actinobactérias foram cultivadas em meio TSBA[®] BBL (Caldo de Triptona de Soja Agar) pelo método de estrias cruzadas, e incubados a $28\pm 1^\circ\text{C}$, por 48 ± 2 horas. Decorrido este tempo, foram coletados, aproximadamente, 40 mg (quatro a seis alças com capacidade para 10 μL) da cultura no 3º quadrante das estrias e transferidas para tubos Kimax (100 X 13 mm). Foram executadas quatro etapas para extração dos ácidos graxos celulares, sendo elas: Saponificação - o reagente de saponificação (metanol, NaOH, H_2O) e alta temperatura provocam a morte e lise das células. Metilação - converte os ácidos graxos em metil ésteres de ácidos graxos, que apresentarão maior volatilidade para análise de cromatografia gasosa. Extração - metil ésteres de ácidos graxos são removidos da fase aquosa e transferidos para a fase orgânica pelo procedimento de extração líquido-líquido. Lavagem - o reagente de lavagem é adicionado para remover ácidos graxos livres e resíduos de reagentes.

Foi utilizado o cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector Flame Ionization Detector (FID), marca Agilent, modelos 6850 e 7683, respectivamente. A interface

foi obtida pelos programas ChemStation A.09.01 [1206] e MIDI Sherlock Microbial Identification System 4.0. A biblioteca selecionada foi a ACTINO.

O tempo da corrida de cada amostra foi de 20,7 minutos. O resultado foi expresso por meio de um cromatograma e um relatório elaborado pelos softwares, que contêm área de picos e tempo de retenção nomeados. O resultado final foi apresentado de acordo com a similaridade (acima de 30%) entre o banco de dados e as áreas nomeadas (MICROBIAL, 2001).

4.4.4 Identificação das espécies de actinobactérias utilizando-se do seqüenciamento do gene 16S rRNA

A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada a partir de culturas líquidas em meio de cultivo BD (batata dextrose) (25 mL) sendo as células posteriormente coletadas, por centrifugação. O DNA foi obtido de acordo com o procedimento adaptado por Doyle e Doyle (1990) que resumidamente consiste em 700 µL do tampão de extração (NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM pH 8,0, PVP-40 1%, CTAB 2%, proteinase K 100 µg/ml e β-mercaptoetanol 0,2%) adicionados às células, seguido de ressuspensão e incubação a 65 °C por 30 min. A suspensão foi extraída com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) por 3 vezes, precipitada com isopropanol, seca ao ar e ressuspendida em TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM). O DNA foi quantificado por meio de espectrofotômetro modelo Lambda Bio da Perkin Elmer. Cinco microlitros do DNA foram analisados em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). Os géis foram documentados utilizando-se o programa “Multi Analyst” do “Fluor-STM Multimager” (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A).

4.4.4.1 Amplificação do gene que codifica o 16S rRNA

O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores para o domínio *Eubacteria* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al., 1991). Amplificações do gene 16S rRNA por PCR foram feitas em volume de 50 µL contendo 5 pmols de oligonucleotídeos iniciadores, 200 µM de cada dNTP, 1 X tampão *Taq*, 1,5 mM de MgCl₂, 2 U Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) e 50 ng de DNA.

A PCR foi realizada em termociclador, de modelo GeneAmp PCR System 9700 – Applied Biosystem com o seguinte ciclo: 3 min. de desnaturação a 94 °C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min., anelamento a 55 °C por 30 seg., extensão a 72 °C por 30 seg. e extensão final a 72 °C por 10 min. A verificação do tamanho dos *amplicons* resultantes foi feita por comparação com o padrão de 100 pb (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil), após corrida eletroforética a 90 V por 35 minutos, em gel de agarose 1%. A documentação do gel foi feita pelo programa “Multi Analyst” do “Fluor-STM Multimager” (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A).

4.4.4.2 Purificação do DNA

Todo o volume do produto de PCR (45 µL) foi transferido para tubos *eppendorf* de 500 µL e adicionados 135 µL de isopropanol 100% e 45 µL de água ultrapura (milli-Q) autoclavada.

A mistura foi homogeneizada (vórtex) por alguns segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 horas a – 20°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 9.000 x g por 25 min., a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado totalmente e adicionado 250 µL de etanol 70% (diluído em água ultrapura imediatamente antes de usar). Homogeneizou-se (vórtex) por alguns segundos e centrifugou-se a 9.000 x g, por 5 min., a temperatura ambiente. O sobrenadante foi totalmente descartado. As amostras foram secas no concentrador de DNA por 10 min. Os precipitados foram ressuspensos em 50 µL de água ultrapura autoclavada. Agitou-se em vórtex seguido de um pulso na microcentrífuga (Qiagen – QIAquick Gel Extraction Kit Protocol).

A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% e o restante foi armazenado em freezer – 20 °C até a próxima etapa (digestão com enzimas de restrição).

4.4.4.3 Seqüenciamento do gene 16S rRNA

A PCR de seqüenciamento dos fragmentos foi feita utilizando o kit de seqüenciamento DYEnamic ET Terminator Cycle (Amersham Biosciences, Inglaterra, UK). A reação foi feita para um volume final de 10 µL onde foram utilizados 200 ng dos fragmentos de interesse; 5 pmoles de oligonucleotídeos iniciadores; 2,0 µL de tampão 2,5 X; 2,0 µL de DYEnamic ET Terminator Cycle. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: rD1 e fD1, além dos conjuntos de oligonucleotídeos internos descritos na Tabela 1, visando o fechamento da

seqüência do gene 16S rRNA. As condições de amplificação para o iniciador T7 foram: 2 min. de desnaturação a 96 °C, seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 96 °C por 45 seg., anelamento a 50 °C por 30 seg., extensão a 60 °C por 4 min., enquanto que para os demais iniciadores tais condições encontram-se a seguir: 4 min. de desnaturação a 94 °C, seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 94 °C, por 1 min.; anelamento a 55 °C por 30 seg. e extensão a 60 °C por 4 min.

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, procedeu-se a precipitação para a eliminação dos dNTPs que não foram incorporados. Foi adicionado 1 µL de tampão acetato de sódio/EDTA, mais 40 µL etanol a 95% (recém preparado). Após a homogeneização por agitação, os tubos foram centrifugados a 9.000 x g por 15 min., a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% foram adicionados. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 min. a 9.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado incubado por 5 min. a 40 °C para secagem. Em seguida o precipitado foi ressuspendido em 10 µL de formamida (HiDi formamida – Applied Biosystems) em microplacas. A microplaca foi colocada em um termociclador para a desnaturação do DNA a 96 °C durante 5 min. e imediatamente colocada no gelo por 2 min. A leitura das bases marcadas foi realizada no Seqüenciador Automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – CENA/USP.

Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16s rRNA.

Seqüência (5'-3')	Posição de alinhamento na seqüência de <i>E.coli</i>
AGA GTT TGA TCC TGC CTC AG	8-28FDI eubactéria
AAG GAG GTG ATC CAG CC	1526-1542RDI eubactéria
CCT ACG GGA GGC AGC AG	341-357F
CTG CTG CCT CCC GTA GG	357
TCT ACG SAT TTC ACC (GC) CT AC	704R
GCA ACG AGC GCA ACC C	1099-1114F
GGG TTG CGC TCG TTG C	1114R

4.4.4.4 Análise filogenética das seqüências de 16S rRNA

Os cromatogramas das linhagens das actinobactérias identificadas gerados pelo seqüenciamento dos isolados foram processados removendo-se as bases de baixa qualidade (< 20) pelos programas Phred/Phrap/Conserd em sistema operacional Linux (EWING et al., 1998; ERWING, 1988; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). As seqüências obtidas foram comparadas com outras seqüências previamente depositadas no Ribosomal Data Project

utilizando-se a ferramenta RDPQuery. A construção e visualização da árvore filogenética foi realizada com o auxílio do programa Mega 3.1 (KUMAR et al., 2004). O alinhamento das seqüências foi realizado pelo programa Custal W 1.8 ([www.ebi.ac.uk:index.html](http://www.ebi.ac.uk/index.html)) (THOMPSON et al., 1994), e as extremidades foram ajustadas de forma que todas elas tivessem o mesmo número de bases completamente alinhadas com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 2001). Este alinhamento foi usado na análise de filogenia feita com o método de distância (“Neighbour Joining”) (SAITOU; NEI, 1987). Para o cálculo da significância estatística da similaridade entre as seqüências foi utilizada uma re-amostragem para 1.000 replicações, originando os valores de *bootstrap* (SWOFFORD et al., 1996).

4.5 Avaliação do potencial de actinobactérias que codificam para os genes NRPS e PKS

Para amplificação de seqüências conservadas de NRPS e PKS, utilizou-se um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 2, confeccionado pela Integrated DNA Technologies, Inc. (Integrated DNA Technologies, INC., Coralville, IA, EUA). A amplificação foi realizada em solução contendo: tampão para a reação PCR 1 X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; MgCl₂ 5 mM; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; 4% de DMSO (dimetilsulfóxido); água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi feita em um termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 94 °C/2 min; 5 ciclos de 94 °C/1 min, 45 °C/1 min, 72 °C/1 min; 30 ciclos de 94 °C/30 s, 50 °C/1 min, 72 °C/4 min; extensão final a 72 °C/15 min. Uma alíquota de 5 µL do produto da PCR foi analisada em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular 100 pb (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). Os géis foram documentados através do programa “Multi Analyst” do “Fluor-STM Multimager” (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A).

Tabela 2. Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores de reação que foram utilizados para amplificação de seqüências conservadas de NRPS e PKS

Iniciador	Seqüência no sentido 5’-3’
MTF	GCN GGY GGY GCN TAY GTN CC
MTR	CCN CGD ATY TTN ACY TG
KS+	MGI GAR GCI HWI SMI ATG GAY CCI CAR CAI MG
KS-	GGR TCI CCI ARI SWI GTI CCI GTI CCR TG

4.6 Curva de crescimento e curva de produção de metabólitos secundários

Para análise de tempo de incubação e padronização de inóculo a ser utilizado em estudos subseqüentes, os isolados selecionados foram submetidos a curva de crescimento.

Para obtenção da curva de crescimento, 3 colônias de actinobactérias aderidas ao ágar foram retiradas da placa de meio de cultura ACA (Amido Caseína Agar) e foram inoculadas em 9 ml de solução salina e agitadas em vórtex por 10 segundos. Desta solução, 4 mL (10^7 células/mL) foram inoculadas em 200 mL de meio mineral líquido modificado (Solução de sais - NaCl 0,015 g; CaCl₂ 0,03 g, MgSO₄ 0,20 g; MnSO₄ 0,015 g; FeSO₄ 0,015 g; (NH₄)HPO₄ 1,0 g e K₂HPO₄ 15 g e 2% de glicose). As culturas, sob agitação a 150 rpm a 28 °C foram analisadas pelo peso seco e por plaqueamento realizado diariamente. Para a análise do peso seco 10 ml de cada amostra foi filtrado à vácuo em papel de filtro e colocadas em estufa de secagem. Após a secagem, foi realizada a 1^o pesagem e o valor obtido foi diminuído do peso do papel sem as células (controle), até se obter o valor estacionário. Para contagem de células, alíquotas de 100 µL foram inoculadas em meio de cultura sólido ACA e diariamente a contagem de células foi realizada. O valor do pH também foi calculado em cada tempo de incubação.

Para a produção de metabólitos secundários foi realizado um teste de contato direto entre o sobrenadante e o microrganismo teste, em cada tempo de incubação. Alíquotas (100 µL) do sobrenadante foram colocadas em discos de antibiose. Esses discos foram inseridos em placas contendo previamente o microrganismo inoculado *Bacillus megaterium*. A análise do halo de inibição foi realizada diariamente. Esta análise foi realizada para se obter o tempo de incubação que a actinobactéria necessita para produzir seus metabólitos ativos, pois em diversos estudos sabe-se que os metabólitos são produzidos no começo da fase estacionária.

4.7 Obtenção de metabólitos secundários

As linhagens foram cultivadas em meio mineral líquido modificado (Solução de sais - NaCl 0,015 g; CaCl₂ 0,03 g, MgSO₄ 0,20 g; MnSO₄ 0,015 g; FeSO₄ 0,015 g; (NH₄)HPO₄ 1,0 g e K₂HPO₄ 15 g e 2% de glicose) sob agitação a 150 rpm a 28 °C durante 168 horas. Após esse período de incubação, 200 mL do meio mineral líquido modificado contendo as linhagens foram filtradas à vácuo. Para a extração foi utilizado o solvente orgânico acetato de etila (1/3 do volume total) para extrair os metabólitos secundários, em funil de separação. Esse processo foi repetido três vezes. As fases orgânicas foram reunidas e secas com sulfato

de sódio anidro (reagente que absorve molécula de água). Após a filtração e evaporação do solvente em evaporador rotatório, obteve-se os extratos brutos (MELO e SANHUEZA, 2008).

4.8 Avaliação da atividade biológica de extratos orgânicos

Os fitopatógenos (*P. aphanidermatum* e *F. moniliforme*), bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *Bacillus megaterium*) e Gram negativas (*E. coli*, *Klebsiella* e *P. aeruginosa*) foram inoculados em placas contendo meio de cultura batata dextrose e agar (BDA) por 24 horas, à 28 °C. Após os patógenos crescerem em toda placa, foram aplicados 20 µL dos extratos orgânicos, em discos S&S (diâmetro ¼ IN) autoclavados para análise de antibióticos, inseridos em placas de Petri contendo os patógenos. Neste procedimento foi observado se houve ou não a formação de halos de inibição. A análise foi realizada em triplicata para cada um dos microrganismos em estudo. Posteriormente, as placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas e foi feita a leitura das mesmas.

4.9 Análise de extratos orgânicos produzidos pelas actinobactérias selecionadas

4.9.1 Determinação de compostos presentes nos extratos orgânicos das linhagens CCMA 30 e CCMA 33 por Cromatografia em Camada delgada

Para determinar a presença dos compostos nos extratos, 10 µL dos extratos brutos das duas linhagens selecionadas foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica GF254 em suporte de alumínio da Merck. Os eluentes escolhidos foram uma mistura de hexano/ acetato de etila/metanol (45:45:10) para o extrato produzido pela linhagem CCMA 30 e para o extrato produzido pela linhagem CCMA 33 foi acetato de etila/metanol (90:10).

A avaliação foi feita observando-se a velocidade de migração dos constituintes da mistura e que foram caracterizados por um valor numérico, R_f, que exprime a relação entre as distâncias percorridas pelo composto e pela frente do solvente.

4.9.2 Bioautografia

A bioautografia é um método que combina a CCD (cromatografia em coluna delgada) com bioensaio *in situ*. Este método mostra a localização exata do constituinte ativo de uma matriz complexa, sendo, portanto, um método eficiente no isolamento biomonitorado pela

atividade através de um cromatograma de referência revelado com um reagente cromogênico. O ensaio de determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia foi realizado de acordo com Hamburger e Hostettmann (1991).

Para avaliar a atividade dos compostos presentes no cromatograma, foi inoculado uma suspensão de 10^8 cels/mL dos fitopatógenos testes (*Fusarium moniliforme* e *Fusarium oxysporium*) e bactéria Gram positiva (*Bacillus megaterium*) em meio de cultura ainda líquido e cada um destes microrganismos foram pulverizados sobre o cromatograma. A placa contendo o cromatograma pulverizado com a suspensão dos fungos testes e também da bactéria foi observada diariamente, verificando se houve ou não a formação de halo de inibição sobre alguns componentes das frações obtidas pelas cromatografias.

4.9.3 Determinação de compostos presentes nos extratos orgânicos por Cromatografia em coluna

O extrato orgânico produzido pela linhagem CCMA 33 foi fracionado (simplificado) em coluna de SEPHADEX-LH 20 (polímero gelatinoso), usando solvente com polaridade alta, metanol. Das frações que foram obtidas, foi feita uma cromatografia em camada delgada e estas foram agrupadas de acordo com a semelhança das frações, quando visualizadas em câmara UV e também quando reveladas por reveladores químicos. A coluna foi empacotada com sephadex LH-20 e metanol.

Para o extrato produzido pela linhagem CCMA 30 utilizou uma coluna de silicagel (0,060 a 0,200 mm) utilizando fases móveis com ordem crescente de polaridade, partindo de 8:2 acetato de etila/hexano até 100% de metanol. Das frações que foram obtidas, foi feita uma cromatografia em camada delgada e estas foram agrupadas de acordo com a semelhança das frações, quando visualizadas em câmara UV e também quando reveladas por reveladores químicos.

4.9.4 Análises por Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE-UV)

As colunas empregadas nos experimentos foram C18 (4,60 x 250 mm) 5u, Phenomenex e CN (4,60 x 250 mm) 5u, Phenomenex. As condições de injeção e as fases móveis usadas foram acetonitrila: água em um fluxo de 1 mL/min, no modo de eluição em gradiente. A injeção da amostra foi feita pelo injetor automático Reodyne com loop de 20µL, usando uma microseringa (para injeção com pressão de até 50 bar). O detector DAD, modelo SPD-10ADVP, colocado na saída da coluna foi de Ultravioleta (UV), o qual proporcionou um

registro contínuo da composição do eluente, o que permitiu obter um cromatograma. Essa análise utilizada permite identificar e quantificar os componentes das amostras.

4.10 Quantificação da atividade antimicrobiana (Concentração Mínima Inibitória)

A atividade antimicrobiana de um composto foi quantificada com base na determinação da concentração mínima do composto capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo, um valor chamado CIM (Concentração Inibitória Mínima), ou MIC ("Minimum Inhibitory Concentration"). Este valor foi determinado pelo método das diluições sucessivas e do método da difusão em Agar. Efetuou-se a determinação da CMI pelo método de diluição em ágar recomendada pela NCCLS (2000).

As frações obtidas dos extratos produzidos pelas linhagens CCMA 30 e CCMA 33 pela técnica de cromatografia em coluna foram avaliadas contra o fitopatógeno *P. aphanidermatum* (CCMA 243). Estas frações foram dissolvidas em DMSO –Dimetilsulfóxido (280 µg/mL). Transferiu-se 1 mL dessa diluição para o tubo subsequente, que continha DMSO (1 mL), cujo procedimento repetiu-se 10 vezes.

Em placa contendo meio de cultura Mueller Hinton pH 7,3, uma suspensão bacteriana de *Bacillus megaterium* (CCMA 281) foi inoculada por toda a placa com auxílio de uma alça de Drigalski. Após 1 h, 20 µl de diferentes diluições dos extratos (280 µg, 140 µg e 70 µg), foram adicionadas em discos S&S (diâmetro ¼ IN) sobre o meio de cultura com a bactéria inoculada. Dessa forma, obteve-se a faixa de concentração de 280 a 70 µg /mL. Placas controle contendo discos de papel filtro com o solvente utilizado na diluição (DMSO), placas contendo apenas o Meio de cultura Mueller-Hinton com a bactéria inoculada e o controle com antibiótico nistatina também foram feitas.

As culturas foram incubadas a 30 °C por 24 horas. Foi considerada a menor concentração que inibiu o crescimento do patógeno. Durante a incubação da placa de Petri a uma temperatura adequada para o crescimento do patógeno, o agente antimicrobiano sofre difusão do disco de papel para o meio sólido. A uma certa distância do disco, o valor CMI é atingido. Um halo (zona transparente) de inibição é formado em volta do disco, onde não crescem colônias do patógeno.

4.11 Análise de extratos orgânicos por espectrometria de massas

4.11.1 Perfil Químico dos metabólitos presentes nos extratos

Para obtenção dos espectros de massas, os extratos produzidos pelas linhagens CCMA 30 e CCMA 33 foram dissolvidos em metanol/acetato de amônio 0,1% (1:1) para uma concentração final de 200 µg/mL e introduzidas no LC/MS por injeção direta via bomba de seringa com fluxo de 20 µg/min. Os espectros foram adquiridos no modo *full scan* (IES-EM) em alta resolução tanto no modo positivo como no modo negativo. Para a dissociação dos íons utilizou-se argônio como gás de colisão (IES-EM/EM). Os espectros de massas adquiridos foram analisados no software Mass Lynx versão 4.0. As condições de análises utilizadas neste experimento foram: voltagem do capilar: 3,87 kV, voltagem do cone: 30 V, temperatura da fonte: 100°; temperatura do gás (nebulizador): 350 °C; fluxo do gás (cone): 20 L.H⁻¹ e fluxo do gás (nebulizador): 350 L.H⁻¹.

IES (Ionização por eletrospray) é considerada uma técnica branda de ionização quando comparada à ionização por impacto de elétrons (IE), tendo como principal característica a produção do íon da molécula protonada [M+H]⁺ ou desprotonada [M-H]⁻, sem que ocorra a fragmentação da mesma, o que possibilita a identificação dos compostos baseada em suas respectivas massas moleculares, uma vez que a detecção é dada a partir da razão massa/carga (*m/z*). De acordo com os sinais de massas observados nos espectros, a derreplicação dos extratos pôde ser realizada (MORAES e LAGO, 2003).

4.12 Derreplicação dos Extratos das Actinobactérias

A derreplicação consiste em um processo de reconhecimento e eliminação prévia de substâncias isoladas presentes em um extrato e tem sido um consenso na química de produtos naturais desde o início da pesquisa de antibióticos. Esse processo acelera o estágio de descoberta de novas substâncias com atividade biológica, e de compostos já caracterizados, mas que não apresentem todas as suas atividades biológicas descritas (CORDELL et al., 1997).

Os extratos e as frações produzidos pelas actinobactérias CCMA 30 e CCMA 33 foram submetidos ao estudo de derreplicação com base nos sinais de *m/z* obtidos nos espectros de IES. As buscas pelos possíveis compostos foram realizadas utilizando o banco de dados *Dictionary of Natural Products* (<http://dnp.chemnetbase.com>).

4.13 Análise dos compostos químicos por ressonância magnética nuclear (RMN)

Para obtenção dos espectros de ressonância, as amostras foram submetidas a um campo magnético externo, de forma que determinados núcleos que apresentam um momento magnético nuclear (núcleos com um número de massa ímpar como ^1H e ^{13}C , por exemplo) possam entrar em ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo a energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo, conforme sua vizinhança química. As análises de RMN foram feitas no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da USP (Ribeirão Preto-SP).

RMN ^1H - Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrômetro BRUKER AC 500 (1,32- Tesla, 500 MHz), a 34,5 °C em tubo de 5 mm de diâmetro. As intensidades dos picos foram determinadas por integração.

Técnicas bidimensionais também foram utilizadas, *gHSQC (Heteronuclear single bond correlation - with field gradient)* a qual fornece a correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (escalar) e a técnica bidimensional *gHSQC (Heteronuclear multiple bond correlation - with field gradient)* que correlaciona os núcleos de hidrogênio (^1H) com Hidrogênio (^1H) e, Hidrogênio(^1H) com Carbono (^{13}C). Estes experimentos fornecem informações sobre a vizinhança de um determinado núcleo, permitindo que os núcleos vizinhos sejam localizados e, assim, a estrutura do composto seja montada (GIL & GERALDES 1987). Essas metodologias foram utilizadas como ferramenta para a identificação química dos compostos ativos, juntamente com outras técnicas analíticas.

4.14 Controle Biológico de *P. aphanidermatum* em pepino sob condições controladas, de casa-de-vegetação

4.14.1 Preparo do sobrenadante de cultura

O preparo do sobrenadante das linhagens selecionadas CCMA 30 e CCMA 33 visaram o controle biológico do fitopatógeno *Pythium aphanidermatum*, causador de tombamento de plântulas.

As linhagens 30 e 33 foram cultivadas em Meio Mineral Líquido Modificado (Solução de sais - NaCl 0,015 g; CaCl₂ 0,03 g, MgSO₄ 0,20 g; MnSO₄ 0,015 g; FeSO₄ 0,015 g; (NH₄)HPO₄ 1,0 g e K₂HPO₄ 15 g e 2% de glicose) sem componentes que são considerados indutores de resistência, como extratos de leveduras, caseínas etc.

O momento de se interromper o cultivo em meio líquido e coletar o sobrenadante foi no ponto de inflexão da fase final logarítmica ou início da fase estacionária da curva de crescimento.

Do sobrenadante, 200 mL foi filtrado em filtro de poro igual ou menor que 0,45 μm e, se não utilizado imediatamente, congelado. Esse sobrenadante contém desde moléculas pequenas como açúcares simples e aminoácidos, passando por polipeptídeos de diferentes tamanhos a macromoléculas, como proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos.

4.14.2 Separação das macromoléculas por diálise

Essa separação, por tamanho, foi feita pelo método de diálise, usando uma membrana com ponto de corte de 12 kD. Para tanto o tubo de diálise foi imerso em solução salina esterilizada por algumas horas. Trabalhou-se em baixas temperaturas, como interior de uma geladeira (4-5 °C), colocou-se 200 mL de sobrenadante no interior da membrana de diálise e a transferiu para um recipiente contendo água destilada em volume 400 vezes maior que o volume de sobrenadante com que se trabalhou. O processo de diálise transcorreu sob contínua agitação, o que pode ser conseguido com o uso de um bastonete magnético grande.

Realizou-se três trocas de água ao longo do processo, que demorou de 12 à 24h., findo o processo, as moléculas maiores que 12 kD estão no interior da membrana de diálise e as pequenas, na água. Após a realização da diálise as moléculas grandes se localizam no interior do tubo ou saco de diálise.

4.15 Controle biológico de *Pythium aphanidermatum*

Sementes de pepino híbrido F1 (Safira) foram plantadas em vasos de 1000 mL contendo solos (800 mL) autoclavados por 1 hora à 120 °C durante 3 dias. Simultaneamente, em bandejas plásticas com capacidade para dois litros, foi preparada uma mistura de solo com e sem a adição de 200 ml de farelo de aveia, para estimular o desenvolvimento da população natural de *Pythium* infestada no solo (LOURD; ALVEZ; BOUHOUT, 1986) e incubados por cinco dias.

Após o aparecimento das folhas cotiledonares de pepino no solo previamente autoclavado, foi adicionado 200 ml da mistura de solo na superfície do vaso, os quais foram mantidos em casa-de-vegetação sob condições controladas (Figura 4).

Realizou-se o experimento em bandejas com os seguintes tratamentos, ao quais foram preparados e colocados na superfície do vaso:

- 1º Tratamento – Testemunha - solo sem tratamento
- 2º Tratamento – Testemunha inoculada- aveia + solo
- 3º Tratamento – aveia + solo+ meio mínimo sem metabólitos;
- 4º Tratamento– aveia + solo + dialisado integral da linhagem CCMA 30;
- 5º Tratamento– aveia + solo + dialisado integral da linhagem CCMA 33;
- 6º Tratamento– aveia + solo + metabólitos da linhagem 30 (sem diálise)
- 7º Tratamento – aveia + solo+ metabólitos da linhagem 33 (sem diálise)
- 8º Tratamento – aveia + solo + suspensão em solução salina da linhagem CCMA 30;
- 9º Tratamento– aveia + solo + suspensão em solução salina da linhagem CCMA 33.

O solo utilizado nos tratamentos citados acima foi coletado no Instituto Biológico de Campinas, o qual já continha o fitopatógeno *Pythium aphanidermatum*.

Cada tratamento foi composto por 5 repetições, cada um com 10 sementes plantadas por vaso. A avaliação do experimento foi realizada diariamente após a adição da mistura no solo autoclavado. Para análise foi feita à média da incidência da doença (tombamento) em cada tratamento. A análise estatística foi feita pelo teste de Scott-Knott, utilizando o Software SISVAR com nível de 5% de probabilidade. Segundo Pimentel (2000), o teste de Scott-Knott não permite ambiguidade presente nos procedimentos de comparações múltiplas, ou seja, não existe a possibilidade de um tratamento ser igual ao melhor e ao pior.

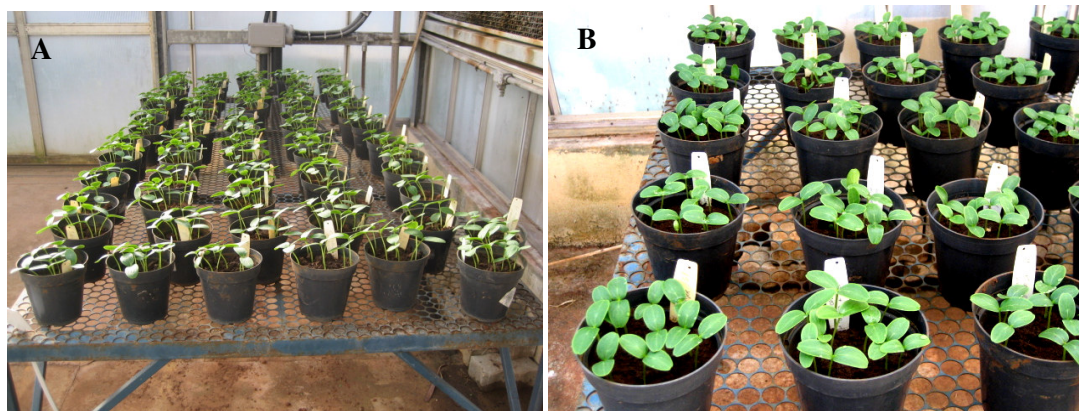


Figura 4. (A) Vista geral do experimento em casa de vegetação. (B) Estádio de folhas cotiledonares em pepino.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e Coleta de actinobactérias

Em um grama de raiz com o solo rizosférico aderido, obteve-se um total de 60 actinobactérias, morfologicamente distintas, isoladas pelo método de diluição em série, utilizando o meio de cultura Amido Caseína - Agar. Obteve-se, por grama de solo, 10^7 UFC em todas as coletas.

O número de actinobactérias isoladas de solos nas diferentes condições variou muito, como era de se esperar, pois as características físico-químicas e microbiológicas dos solos geralmente são distintas (LACEY, 1973). A variedade de milho que apresentou uma maior diversidade de espécies de actinobactérias neste estudo foi a Crioulo, plantada em sistema agroflorestal na cidade de Ribeirão Preto SP. Os gêneros encontrados nesta região em sua maioria foram *Streptomyces*, porém diferenciando em nível de espécies. Seis espécies diferentes de *Streptomyces* foram isoladas da rizosfera de milho da variedade Crioulo entre elas estão; CCMA02, CCMA 12, CCMA 30, CCMA31, CCMA32 e CCMA 35 e uma outra espécie de actinobactéria foi isolada *Amycolaptopsis lexingtonensis*.

Da variedade de milho AG 1051 coletada na cidade de Socorro, obteve-se 4 diferentes espécies de *Streptomyces* CCAL 06, CCAL 10, CCAL16 e CCAL29. E da variedade AL 30 (CATI VERDE) obteve-se 3 espécies diferentes de *Streptomyces*; CCPL53, CCPL 58 e CCPL 60 e 2 gêneros diferentes *Nocardia sp* e *Amycolaptopsis tolypomycina*.

Segundo Keast e Tonkin (1983) o isolamento de actinobactérias rizosféricas, não é uma tarefa fácil, pois o insucesso no isolamento de actinobactérias da rizosfera pode ser verificado devido ao fato da suspensão utilizada estar muito diluída.

5.2 Triagem para seleção de linhagens produtoras de antibióticos

Todos os 60 isolados foram avaliados quanto ao antagonismo contra alguns fungos e bactérias, cujos ensaios serviram para selecionar e caracterizar aqueles isolados mais promissores, visando estudos subseqüentes.

Pelos resultados obtidos verificou-se que 41 isolados apresentaram atividade contra, pelo menos, um dos microrganismos testados. Porém, dentre estas 41 linhagens, duas linhagens CCMA 30 e CCMA 33 apresentaram halos de inibição bastante representativo contra todos os microrganismos testados. Destas 41 linhagens ativas 23 (56%) delas inibiram

bactérias Gram positivas, 20 (49%) isolados foram capazes de inibir bactérias Gram negativas e 29 linhagens (71%) apresentaram halos de inibição contra fungos. A linhagem escolhida para os demais testes de produção de metabólitos foram as linhagens CCMA 30 e CCMA 33, pois estas apresentaram alta inibição frente a todos os microrganismos testados, incluindo o fungo *Pythium aphanidermatum* (Figura 5), que será alvo de estudo em condições naturais.

A Tabela 3 mostra os isolados de actinobactérias com atividade antimicrobiana, onde verificou-se que a intensidade da inibição (+) foi medida pela distância entre a actinobactéria e a bactéria e o fungo alvo.

Estudos anteriores demonstram que isolados de actinobactérias apresentam maior atividade contra bactérias Gram positivas do que contra bactérias Gram negativas. Um desses estudos é o de González e colaboradores (2005), os quais trabalharam com 337 isolados e encontraram atividade antimicrobiana somente em 27% deles, sendo que a atividade mais freqüentemente encontrada foi contra bactérias Gram positivas (23%), contra *Candida albicans* 10,7% e a menor atividade foi contra bactérias Gram negativas (6,5%). Em outro estudo com 86 isolados (ZITOUNI *et al.*, 2005), todos os isolados apresentaram forte atividade contra bactérias Gram positivas, apresentaram atividade moderada contra leveduras, mas a atividade observada contra bactérias Gram negativas foi fraca a moderada e pouco freqüente. Ainda em outro estudo feito por Saadoun e Gharaibeh (2003) 18 de 60 isolados tiveram atividade contra bactérias Gram positivas e somente 7 contra Gram negativas. Assim, podemos verificar que os resultados obtidos estão de acordo com a literatura. As linhagens selecionadas, nesse estudo, tanto para bactérias Gram negativas quanto para bactérias Gram positivas e fungos.

Desta triagem em placa, foram selecionados os isolados CCMA 30 e CCMA 33 por apresentarem alta inibição contra os microrganismos testados, principalmente contra os fungos de solo associados às podridões e ao tombamento de plântulas, e algumas espécies do gênero *Pythium* estão entre as mais preocupantes, pois estão amplamente distribuídas e afetam uma grande variedade de culturas de importância econômica (MARTIN e LOPER, 1999).

Tabela 3. Atividade antagonística dos isolados de actinobactérias rizosféricas de milho contra alguns patógenos.

Isolados	Variedades	Locais de coleta	*Atividade contra						
			<i>F. m</i>	<i>P.a</i>	<i>B. m</i>	<i>E. Coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Pseudomonas</i>
CCMA 01	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	-	-	-
CCMA 02	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	++	+	-	-	-	-
CCAL 03	AG 1051	Socorro	-	-	+	-	-	-	-
CCAL 04	AG 1051	Socorro	-	+	-	-	-	-	-
CCAL 06	AG 1051	Socorro	-	++	-	-	-	-	-
CCPL 07	CATI Verde	Serra Negra	-	-	-	-	-	-	-
CCPL 09	CATI Verde	Serra Negra	-	-	-	-	-	-	-
CCAL 10	AG 1051	Socorro	-	++	-	-	-	-	-
CCMA11	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	-	-	-
CCMA 12	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	+	++	-	-	-	-	-
CCPL13	CATI Verde	Serra Negra	-	-	-	-	+	-	+
CCAL14	AG 1051	Socorro	-	-	-	-	-	-	-
CCAL15	AG 1051	Socorro	-	-	+	-	+	-	+
CCAL 16	AG 1051	Socorro	-	++	-	-	-	-	-
CCMA18	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	-	-	-
CCMA19	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	-	-	-
CCAL 20	AG 1051	Socorro	-	+	+	+	+	+	-
CCAL 22	AG 1051	Socorro	-	+	-	-	-	-	-
CCMA 23	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	-	-	-
CCPL 25	CATI Verde	Serra Negra	-	-	-	+	+	-	+
CCMA 26	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	+	-	+
CCAL 27	AG 1051	Socorro	-	+	+	+	+	+	-
CCPL 28	CATI Verde	Serra Negra	-	-	-	-	-	-	-
CCMA 29.1	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	++	+	+	+	+	-
CCMA 29.2	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	+	+	+	+	+	-
CCMA 30	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	+	+++	+	+	++	+	+
CCMA 31	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	++	+	+	+	+	-
CCMA 32	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	++	-	-	+	-	+
CCMA 33	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	+	+++	++	+	++	+	+
CCMA 34	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	+	-	+	+	+	+
CCMA35	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	++	-	-	-	-	+
CCPL 36	CATI Verde	Serra Negra	-	-	-	-	-	-	-
CCAL 37	AG 1051	Socorro	-	-	+	-	+	-	-
CCAL 38	AG 1051	Socorro	-	-	-	-	-	-	-
CCAL 39	AG 1051	Socorro	-	++	-	++	-	-	+
CCMA 40	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	+	+	-
CCMA 41	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	++	-	-	+	-	-
CCPL 42	CATI Verde	Serra Negra	-	-	+	-	+	-	-
CCMA 43	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	-	-	-
CCMA 44	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	+	-	-	-	-	-
CCPL 45	CATI Verde	Serra Negra	-	-	-	-	-	-	-
CCPL 46	CATI Verde	Serra Negra	-	++	-	-	-	-	-
CCAL 47	AG 1051	Socorro	-	-	-	-	-	-	-
CCAL 49	AG 1051	Socorro	-	-	-	-	+	-	-
CCPL 50	CATI Verde	Serra Negra	-	-	-	+	-	-	+
CCMA 51	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	-	-	-
CCPL 52	CATI Verde	Serra Negra	-	+	-	-	+	-	-
CCPL 53	CATI Verde	Serra Negra	-	++	-	+	+	+	+
CCMA 54	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	-	-	-
CCAL 55	AG 1051	Socorro	-	-	+	+	+	+	-
CCAL56	AG 1051	Socorro	-	++	-	-	-	-	-
CCAL 57	AG 1051	Socorro	-	+	-	-	-	-	-
CCAL 58	AG 1051	Socorro	-	++	-	-	-	-	-
CCPL 60	CATI Verde	Serra Negra	-	++	-	-	-	-	-
CCPL 63	CATI Verde	Serra Negra	-	-	-	-	-	-	-
CCPL 65	CATI Verde	Serra Negra	-	-	-	-	-	-	-
CCMA 66	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	-	-	+
CCMA 68	Crioulo	Ribeirão Preto (SAF)	-	-	-	-	-	-	-
CCPL 71	CATI Verde	Serra Negra	+	+	-	-	-	-	-
CCPL 72	CATI Verde	Serra Negra	-	+	-	-	-	-	+

**F.m* -*Fusarium moniliforme* (LMA 38); *P.a*-*Pythium aphanidermatum* (CCMA 243); *B. m*-*Bacillus megaterium* (CCMA281); *E. coli*-*Escherichia coli* (CCMA 104); *S. aureus*-*Staphylococcus aureus* (CCMA 190); *Klebsiella*- *Klebsiella sp* (CCMA540); *Pseudomonas*- *Pseudomonas aeruginosa* (CCMA120).

- = sem inibição/ + = fraca inibição (1-3 mm) / ++ = inibição moderada (4-10 mm) / +++ = forte inibição (mais de 10 mm).

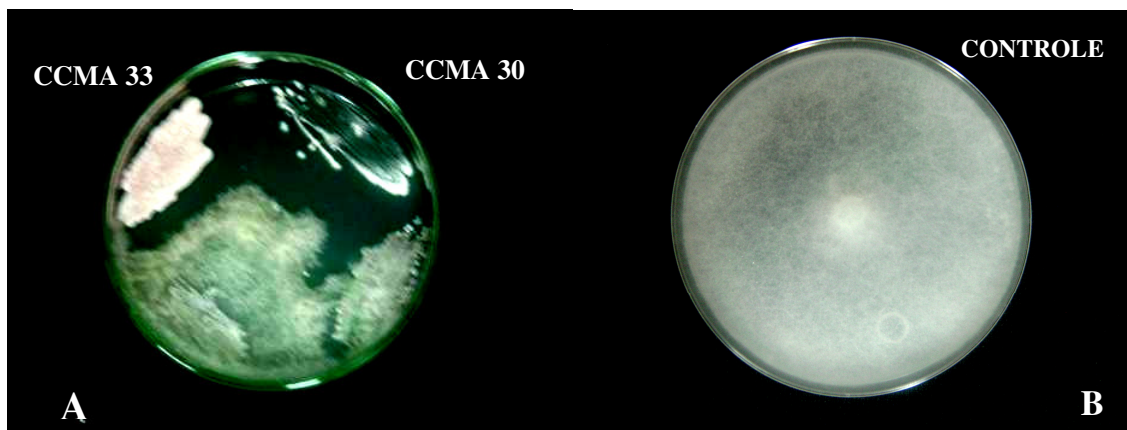


Figura 5. (A) Teste de antagonismo das linhagens CCMA 30 e CCMA 33 isoladas da rizosfera de milho frente ao patógeno, *Pythium aphanidermatu*. (B) Controle com o patógeno *Pythium aphanidermatum* (CCMA 243).

5.3 Identificação das actinobactérias selecionadas

5.3.1 Análise morfológica dos isolados

Os isolados selecionados pelo potencial de inibição contra patógenos testes, CCMA 33 e CCMA 30 (Figura 6), apresentaram esporulação do micélio aéreo, com colônias bem aderidas ao ágar. As colônias também produziram pigmentos solúveis, como visto nos isolados CCMA 30 e CCMA 33 (Tabela 4) que podem ser observados ao colocar a placa de Petri contendo a colônia contra a luz. No entanto, as características da colônia, como coloração micelial e pigmento solúvel, dependem do tipo de meio de cultura utilizado (CROSS, 1989). Contudo, as características fenotípicas encontradas neste estudo em discussão estão de acordo com aquelas descritas para o gênero *Streptomyces*.

Pela análise das colônias crescidas que se encontram aderidas no ágar observou-se em microscopia eletrônica de varredura que os isolados CCMA 33 apresentaram formação de cadeias de esporos longas e em espiral circular. Em contrapartida, o isolado CCMA 30 apresentou cadeias de esporos em espiral retas e longas. As cadeias de esporos ainda variaram quanto à coloração, violeta-roxo para o isolado CCMA 33 e branco-rosa para o isolado CCMA30. Além disso, os isolados foram caracterizados pela análise molecular do gene 16S rRNA e quimicamente pelo método de perfil de ácidos graxos da parede celular, somente encontrado em bactérias.

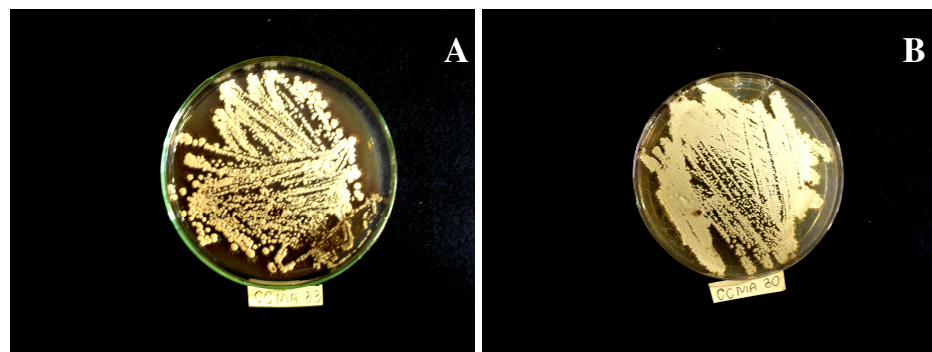


Figura 6. (A) Actinobactéria CCMA 33 cultivada em meio sólido ACA; (B) Actinobactéria CCMA 30 cultivada em meio sólido ACA

Tabela 4: Características morfológicas dos isolados CCMA 30 e CCMA 33.

Isolados	Cadeia de esporos			Micélio Aéreo	Produção de Pigmentos
	Formato	Comprimento	Coloração		
CCMA 30	Espiral	Longa	Branco-rosa	Presente	Ausente
CCMA 33	Espiral	Curta	Violeta - Roxa	Presente	Violeta – Roxo

A microscopia eletrônica de varredura revelou estruturas espirais e longas da cadeia de esporos da linhagem CCMA 30 e também uma visão espacial de toda estrutura que compõe essa linhagem CCMA 30 em estudo (Figura 7). A Figura 8 revelou estruturas da cadeia de esporos de formato espiral e de comprimento curto e uma complexa estrutura espacial da actinobactéria CCMA 33.

A microscopia eletrônica de *varredura* permitiu a observação de certas estruturas, proporcionando, assim, uma visão tridimensional da amostra, diferentemente do microscópio eletrônico tradicional, que só permite a observação de *cortes* finíssimos da estrutura estudada.

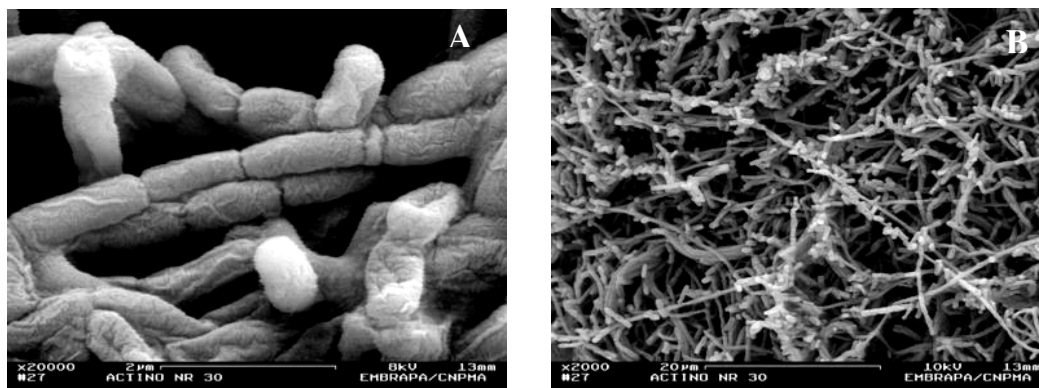


Figura 7. (A) Microscopia eletrônica de varredura da linhagem CCMA 30, mostrando cadeias de esporos em espiral e longa; (B) Microscopia eletrônica de varredura, mostrando uma visão espacial da complexa estrutura dessa linhagem.

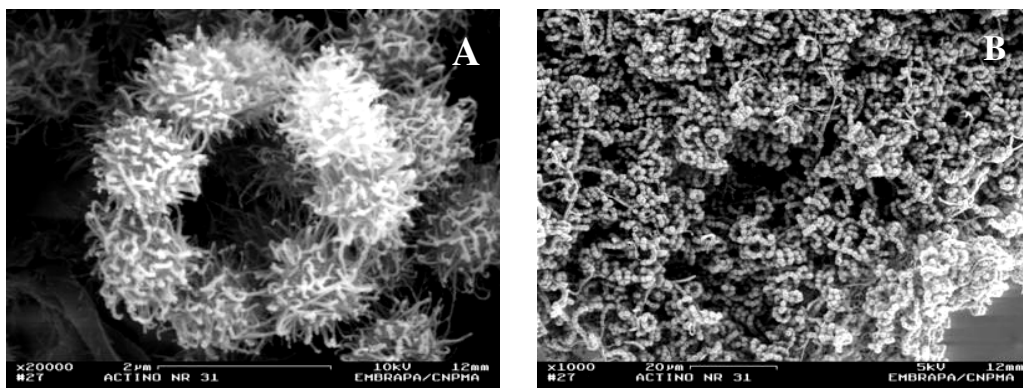


Figura 8. (A) Microscopia eletrônica de varredura da linhagem CCMA 33, mostrando cadeias de esporos em espiral e circular; (B) Microscopia eletrônica de varredura, mostrando uma visão espacial da complexa estrutura dessa linhagem.

5.3.2 Métodos de identificação utilizando o seqüenciamento do gene 16s rRNA e o perfil de ácidos graxos (FAME)

Os resultados relacionados à taxonomia mostraram que dos isolados submetidos à identificação utilizando o gene 16S rRNA, 20 apresentaram similaridade alta nesta técnica (Tabela 5). Amostras de solos rizosféricos de plantas de milho do Estado de São Paulo apresentaram pouca diversidade quanto ao número de gêneros (*Streptomyces*, *Nocardia* e *Amycolaptosis*). A extração de DNA genômico das culturas puras de actinobactérias foram realizadas com êxito, que foi desenvolvido visando à obtenção de DNA de todos os gêneros deste grupo de organismos conhecidos até o momento. Para regiões híbridas os melhores resultados foram obtidos com o Kit Ultra Clean Soil DNA (MOBio) devido a grande quantidade (200 ng) de DNA genômico que é necessário para a reação de amplificação com a mistura de DNA polimerase. Linhagens representantes de 3 ordens de actinobactérias (*Streptomyces*, *Nocardia* e *Amycolaptosis*) foram selecionadas para este trabalho e a boa qualidade dos DNAs genômicos extraídos foi comprovada pelos eficientes resultados alcançados com a amplificação por PCR de seqüências de interesse, NRPSs e PKSs.

Tabela 5. Identificação das actinobactérias selecionadas pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA depositadas como linhagem Tipo no banco de dados RDP.

Isolados	Identificação por 16s RNA	Similaridade (%)
CCMA02	<i>S. lomondensis</i> ,	97,89
CCAL06	<i>S. griseorubiginosus</i>	99,30
CCAL10	<i>S. sampsonii</i>	98,59
CCMA12	<i>S. violaceolatus</i>	98,93
CCAL16	<i>S. lomondensis</i>	97,89
CCAL29	<i>S. africanus</i> ,	98,06
<u>CCMA30</u>	<i>S. griseorubiginosus</i>	99,29
CCMA31	<i>S. tuius</i> ,	99,12
CCMA32	<i>S. eurythermus</i>	99,47
<u>CCMA33</u>	<i>S. griseorubiginosus</i>	99,12
CCMA35	<i>S. sampsonii</i>	98,59
CCAL39	<i>S. griseorubiginosus</i>	96,81
CCMA41	<i>A. lexingtonensis</i>	98,93
CCMA44	<i>S. lomondensis</i>	99,47
CCPL46	<i>Nocardia</i> sp. IFM 0323	95,24
CCPL53	<i>S. resistomycificus</i>	95,11
CCAL56.1	<i>S. africanus</i> ,	96,88
CCAL56.2	<i>S. africanus</i> ,	98,75
CCPL58	<i>A. tolypomycina</i>	99,64
CCPL60	<i>S. coelestis</i>	96,00

A seqüência parcial de nucleotídeos foi obtida usando os iniciadores F968/R1387, cujo tamanho esperado era de aproximadamente 450 pb, foi de 366 pb devido à baixa qualidade das extremidades dessa seqüência, as quais foram retiradas. Essa seqüência apresentou 90% de identidade com seqüências de *Streptomyces* pela análise de afiliação (RDPQuery). A

identidade das seqüências de 16S rRNA acima de 98 % indica que a linhagem pertence a mesma espécie (STACKEBRANDT e GOEBEL 1994). Assim, baseando-se nesse resultado pode-se dizer que os dois organismos isolados são pertencentes à espécie *S. griseorubiginosus*. As relações filogenéticas da seqüência obtida com outras depositadas no banco de dados e analisadas por meio do método da distância (“neighbour-joining”) mostraram que as actinobactérias isoladas neste estudo formam um clado monofilético com a linhagem de *Streptomyces griseorubiginosus* selecionada do banco de dados. Entretanto, a seqüência dessas actinobactérias apresenta uma maior diversidade quando comparada com as das outras linhagens de *Streptomyces* analisados. Isso é evidenciado pelo tamanho do ramo formado na árvore filogenética (Figura 9).

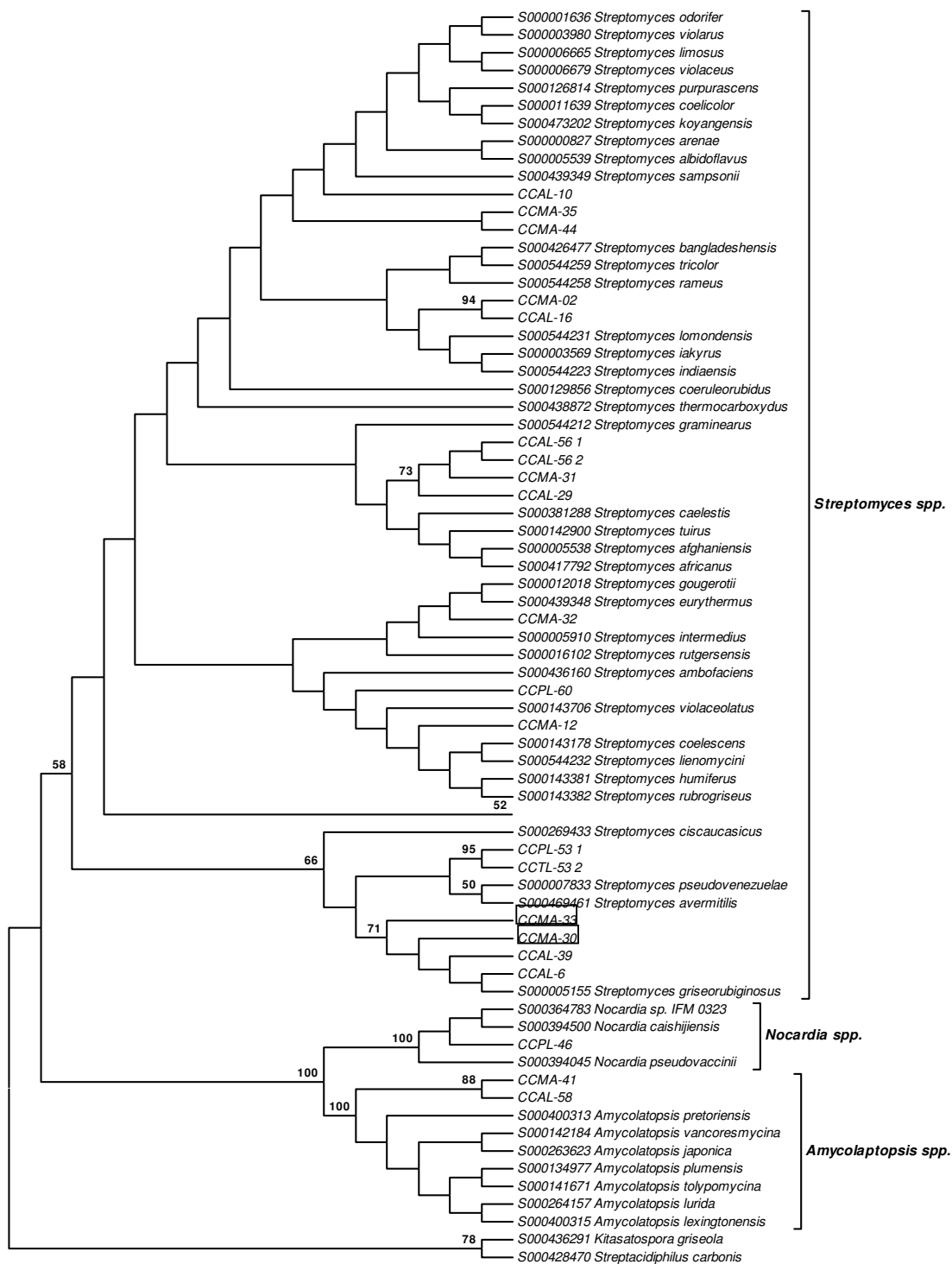


Figura 9. Relações filogenéticas entre a seqüência parcial de 16S rRNA das linhagens CCMA 30 e CCMA 33 e de outras linhagens de *Streptomyces* retiradas do RDP database. O organismo cuja região do 16S rRNA foi seqüenciada neste estudo está em negrito. Valores superiores a 50% na reamostragem de 1000 árvores são indicados nos clados.

Após a identificação das actinobactérias rizosféricas pelo seqüenciamento do gene 16s rRNA procedeu-se novamente à identificação das actinobactérias CCMA 30 e CCMA 33 pela técnica de análise de ácidos graxos (FAME), para se ter a confirmação das linhagens isoladas. Outros fatores que podem diferenciar algumas actinobactérias são a composição da parede celular e o perfil de ácidos graxos (STACKEBRANDT et al. 1997). A análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME) é uma técnica que vem sendo amplamente utilizada no estudo de comunidades microbianas, visto que alguns grupos apresentam perfis lipídicos únicos. Esse método de análise é útil na identificação individual de bactérias (espécies e subespécies) (ELVIRA-RECUENCO e VAN VUURDE, 2000).

As linhagens CCMA 30 e CCMA 33 apresentaram similaridade de identificação de 58,5% e 64,3% para *Streptomyces violaceusniger*, respectivamente, pela técnica do FAME.

Porém a biblioteca existente no equipamento foi considerada pouco eficiente devido ao baixo número de espécies depositadas na biblioteca ACTINO. Esta técnica foi utilizada para obtenção das identificações das linhagens selecionadas a fim de se obter uma análise comparativa entre as linhagens identificadas pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA, onde as linhagens CCMA 30 e CCMA 33 foram identificadas com 99,29% e 99,12%, respectivamente, como *Streptomyces griseorubiginosus*. O resultado para a identificação do FAME não foi satisfatório, portanto essa comparação não foi possível, devido a baixa similaridade (menor que 60%) que essas linhagens de actinobactérias apresentaram com os dados existentes na biblioteca do método.

A composição da parede celular varia consideravelmente entre os diversos grupos de actinobactérias. Pode-se diferenciar alguns grupos de paredes celulares baseando-se em dois aspectos principais: o aminoácido dibásico presente na parede, e a presença de açúcares característicos. Todos os tipos de parede celular contêm alanina, ácido glutâmico, glucosamina e ácido murâmico, mas apresentam algumas diferenças, portanto sendo difícil de identificá-las (STACKEBRANDT et al. 1997)..

5.4 Genes que codificam para NRPS e PKS

As linhagens que apresentaram identidade com gênero *Streptomyces* maior que 95% identificadas pelo seqüenciamento do gene do 16S rRNA foram analisadas quanto à presença dos genes que codificam para NRPS e PKS. No total 18 isolados apresentaram genes que codificam para PKS (Figura 11) e somente 4 para NRPS (Figura 10). A distribuição dos genes que codificam para NRPS e PKS dos isolados foi analisada através da amplificação por PCR.

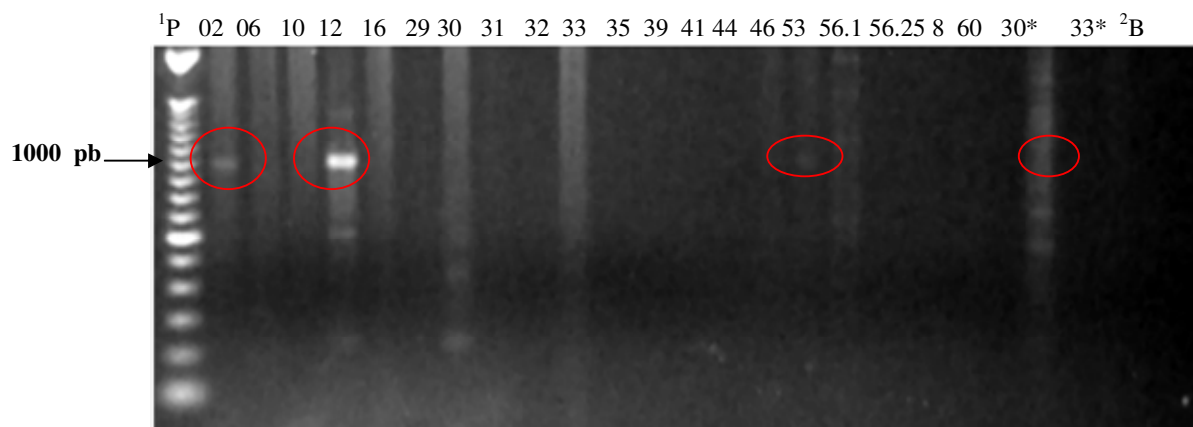


Figura 10. Gel de agarose mostrando bandas que apresentam genes que codificam para a enzima NRPS, as linhagens que apresentaram o gene foram 02, 12; 53 e 30*.

Linhagens CCMA 30 e CCMA 33* / ¹P Padrão contendo 1000pb / ²B Branco, sem os primers

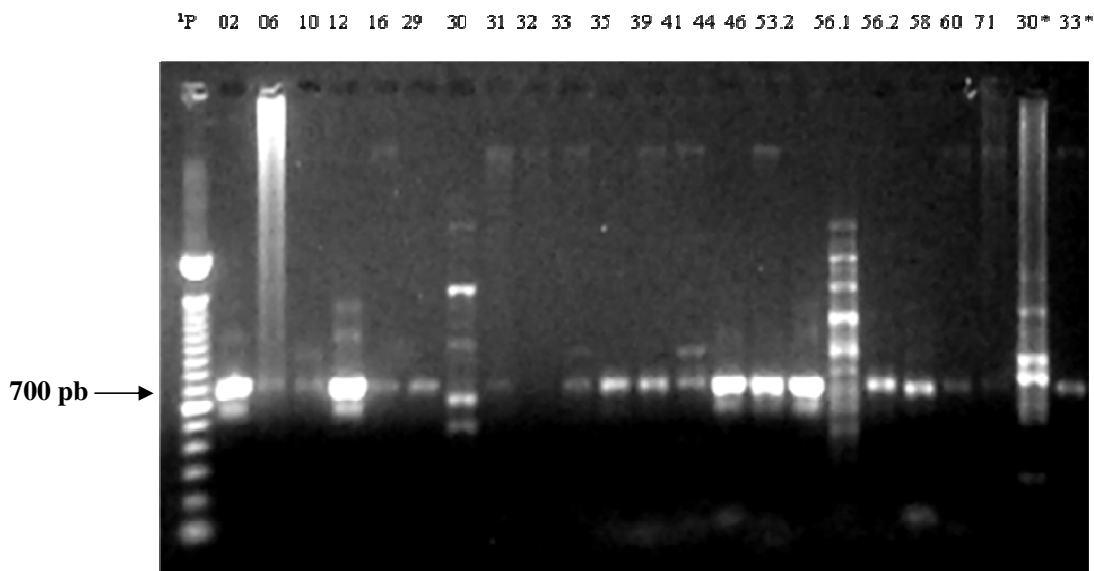


Figura 11. Gel de agarose mostrando bandas que apresentam genes que codificam para a enzima PKS, as linhagens que apresentaram o gene foram; 02, 06, 10,12, 16, 29, 30, 31, 33, 35, 39, 41, 44, 46, 53, 56.1, 56.2 e 71.

*Linhagens CCMA 30 e CCMA 33 / ¹P Padrão contendo 1000pb.

Das 20 linhagens identificadas 20% apresentaram o gene que codifica para NRPS e 80% foram negativo para esse gene, enquanto 90% dos isolados apresentaram o gene para PKS e 10 % foram negativo para esse gene. As seguintes espécies apresentam o gene que codifica para NRPS: 02, 12; 53 e 30*. Do mesmo modo, as seguintes espécies apresentam o gene que codifica para PKS: 02, 06, 10, 12; 16, 29, 30, 31, 33, 35, 39, 41, 44, 46, 53, 56.1, 56.2 e 71. Verificou-se que a maioria das actinobactérias apresentaram esses genes (PKS), sugerindo que a biossíntese desses compostos pode ser realizada pela via não-ribossomal.

A via não-ribossomal está envolvida na síntese de um grande número de compostos biologicamente ativos importantes que são produzidos por microrganismos. Os produtos dessas complexas vias possuem várias propriedades farmacológicas, incluindo antibióticos, agentes antitumorais e imunossupressores (JENKE-KODAMA et al., 2005).

Nas últimas décadas têm crescido a busca por metabólitos biologicamente ativos produzidos por bactérias. A detecção de seqüência de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários para avaliar o potencial biossintético tem sido descrita (SOSIO et al., 2000; CHRISTIANSEN et al., 2001 e SIGMUND et al., 2003) em diferentes grupos taxonômicos. Essa abordagem pode representar uma alternativa na busca não somente em grupos de microrganismos de interesse taxonômico, mas também em isolados selvagens com potenciais metabólicos.

Segundo Challis e Naismith (2004) as NRPSs são constituídas por módulos que são responsáveis pela incorporação de um resíduo na cadeia de peptídeo nascente. Cada módulo é responsável por ativação, adenilação, tioesterificação, condensação e modificação de um substrato (aminoácido) específico.

Os policetídeos são sintetizados por bactérias, fungos, animais e plantas. Em plantas os policetídeos apresentam diversas funções: pigmentação de flores, resposta a exposição de luz UV, defesa contra patógeno (fitoalexinas). PKS específicos de plantas são chalcona sintase (CHS) e 2-pirona sintase (2-PS); Estas enzimas apresentam 74% de seqüência idêntica de aminoácidos. Entretanto, elas diferem no substrato selecionado e no número de reações de condensação (JEZ et al., 2000).

A descoberta de novos genes da via de biossíntese de antibióticos atualmente não é mais uma dificuldade, pois existe seqüenciamento do genoma microbiano que permite a identificação de todos os clusters de PKSs e a rede regulatória. Ex.: *Streptomyces coelicolor* e *Streptomyces avermitilis*, rastreamento de uma biblioteca de cosmídeo de uma determinada bactéria para os genes de PKSs Modulares e Metagenômica: biblioteca de DNA obtida de amostras do ambiente (WEISSMAN e LEADLAY, 2005).

5.5 Curva de crescimento e de produção de antibióticos

As linhagens de *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 30 e CCMA 33 que apresentaram potencial de inibição frente aos diferentes patógenos testados foram submetidas a uma análise da curva de produção de metabólitos e também curva de crescimento. O meio de cultura utilizado tanto para análise de produção de metabólitos quanto para curva de

crescimento foi o meio mínimo, este meio relativamente pobre possibilitou uma produção eficiente de metabólitos e possibilitou um crescimento homogêneo das células. Este meio foi ideal, pois proporcionou a esse estudo uma boa produção de metabólitos num tempo mínimo, dificultando, o crescimento de contaminantes e sendo, sobretudo econômico. Segundo o site Bioexetanol (www.bioexetanol.com) a escolha de um bom meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto a escolha do microrganismo. O meio deve fornecer nutrientes necessários para a síntese de material celular, em especial merecem destaque as fontes de nitrogênio, carbono e energia. Interessante é que se pode em um meio de cultura classificar cada componente de acordo com sua função bem definida, entretanto reside no fato de uma substância poder ter função múltipla para a célula. Assim por exemplo uma proteína pode pelo menos teoricamente, funcionar como fonte de nitrogênio, carbono, energia, enxofre e mesmo certos fatores exigidos pelo microrganismo como aminoácidos, peptídeos, etc.

As duas linhagens de *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 30 e CCMA 33 obtiveram um grande crescimento (10^7 UFC/ mL) em 168 horas quando analisados pelo n° de contagem de células/mL e, verificou-se que para análise do cálculo do peso seco, esta medida não foi muito significativa para contagem de células, uma vez que ocorreram oscilações de valores, porém, pôde se verificar acréscimo dos valores.

O melhor método para calcular curva de crescimento para esta classe de microrganismos foi a contagem do número de células por mL, realizado por plaqueamento. Para tal utilizou diluições de até 10^{-7} para a contagem, obtendo resultados correlatos com o tempo de incubação. Observou-se também que a medida que ocorreu o crescimento desses microrganismos, o pH sofreu um decréscimo pequeno, acidificando o meio para 7,00 (Figura 12). Este estudo constatou o pico de inflexão, final da fase exponencial ao começo da fase estacionária, onde se pôde verificar a produção dos metabólitos secundários. Fase estacionária, uma fase de escassez de nutrientes e acúmulo de metabólitos secundários (HUGENHOLTZ, 2002).

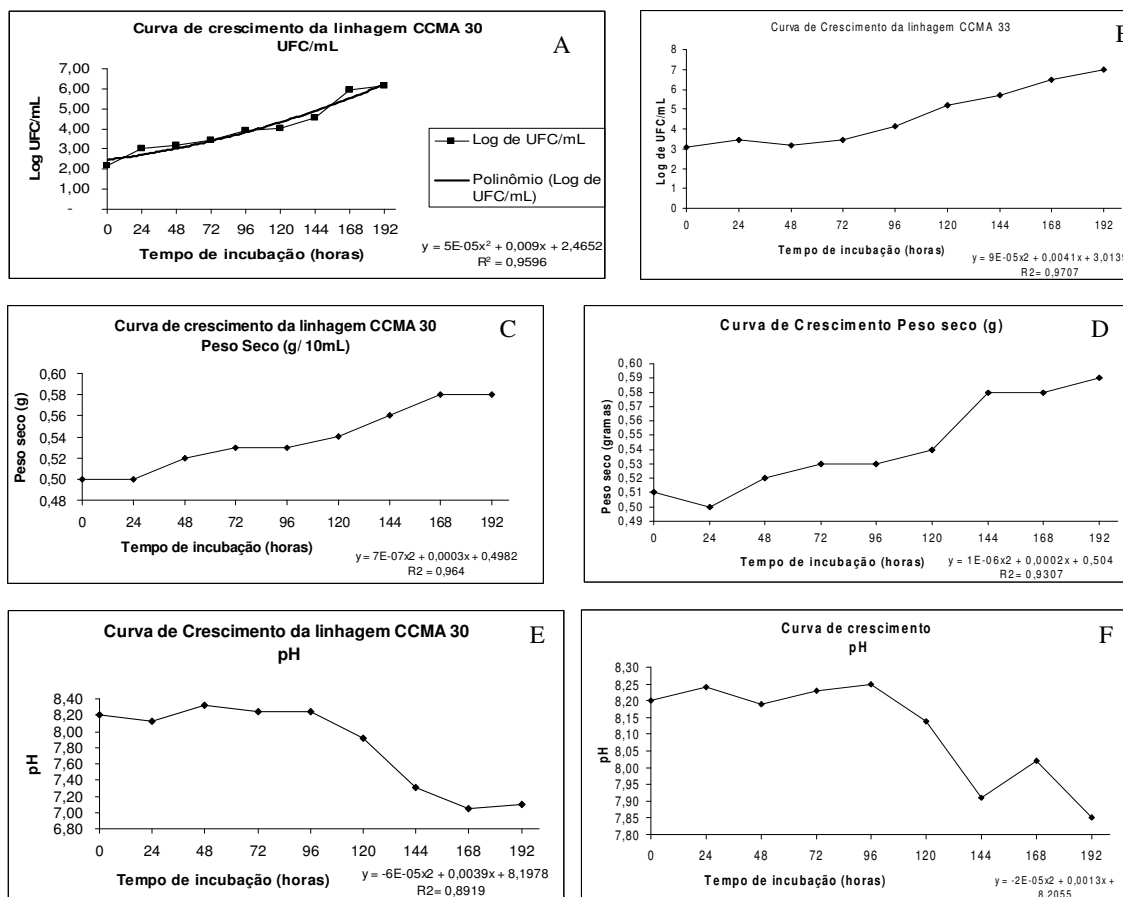


Figura 12. (A-B) Curva de crescimento das linhagens de *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 30 e CCMA 33, pelo método de contagem em placas UFC/mL, (C-D) Curva de crescimento da linhagem CCMA 30 e CCMA 33, pelo peso seco (g), (E-F) Curva de crescimento da linhagem CCMA 30, pelo análise de pH.

5.6 Extração de metabólitos secundários

Com as extrações dos meios de cultura (meio mineral) com acetato de etila determinou-se qualitativamente a capacidade dos metabólitos extraídos de inibir o crescimento miceliano dos fungos *Fusarium moniforme* e *Pythium aphanidermatum*, das bactérias Gram positivas *Bacillus megaterium* e *Staphylococcus aureus* e das bactérias Gram negativas *Klebsiella sp.* *Escherichia. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Das 60 linhagens de actinobactérias que foram isoladas todas foram submetidas a extração de metabólitos, somente 23 linhagens de actinobactérias apresentaram atividade antifúngica (Tabela 6). Os resultados mostraram novamente que as linhagens de *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 30 e a CCMA 33 apresentaram valores bastante significativos na formação de halos de inibição principalmente

contra o patógeno *Pythium aphanidermatum* sendo, portanto escolhida essas linhagens para se obter a identificação dos compostos bioativos.

Os resultados apresentados na Figura 13 mostraram a capacidade do solvente acetato de etila de extraír os metabólitos secundários, especificamente antifúngicos. Uma das características principais deste reagente é possuir alto poder extrativo e rápida evaporação, considerado na escala de polaridade como, polaridade intermediária, e tendo a capacidade de extrair grande número de compostos.

O acetato de etila é um líquido incolor, muito volátil, de odor etéreo geralmente perceptível entre 200 e 300 ppm. É pouco miscível na água (1,32 g em 100 g de água a 20 °C) embora miscível com a maioria dos solventes orgânicos. Por outro lado, o acetato de etila dissolve um grande número de substâncias tais como as gorduras, óleos e resinas e portanto foi um bom solvente para extrair compostos antifúngicos das linhagens, pois através do teste de antibiose observou-se uma boa formação do halo de inibição contra os patógenos.

Segundo Romeiro et al. (1999) apesar da diversidade ainda vista quanto à atividade antagônica, alguns isolados de actinobactérias inibiram o crescimento, exclusivamente, dos mesmos isolados do patógeno, enquanto outros inibiram muitos isolados em comum, sugerindo existência de diversidade da capacidade antibacteriana dentro do grupo como um todo. Este tipo de comportamento não é avaliado, pois na maioria das vezes, trabalhos, mesmo que testem uma grande população de possíveis antagonistas, são feitos para um ou poucos patógenos ou para um ou alguns isolados distintos de um só patógeno. Porém os dados encontrados estão de acordo com os obtidos por Keast e Tonkin (1983), que sugeriram segregação de atividade antifúngica de actinobactérias estudadas.

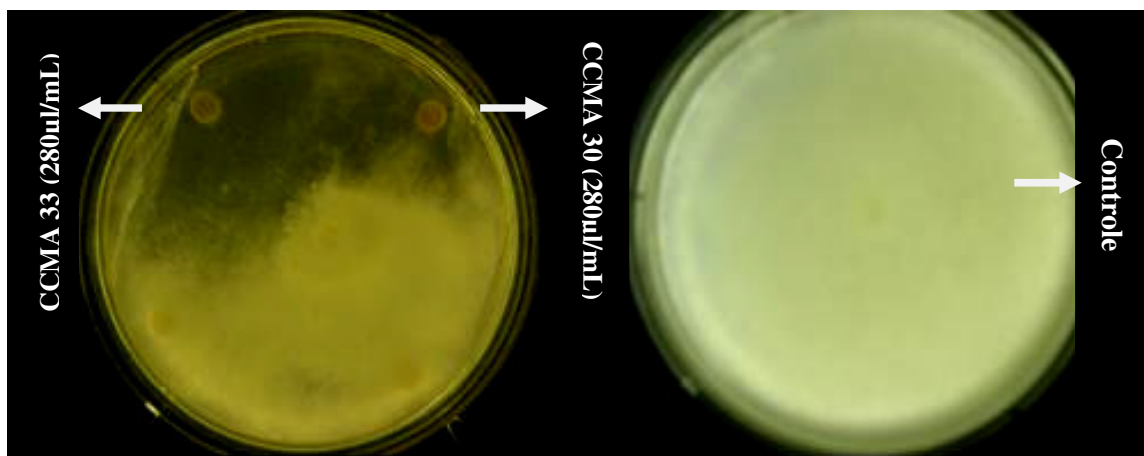


Figura 13: Teste de antibiose dos extratos (280µL/ML) da linhagem CCMA33 e CCMA 30 contra o patógeno *Pythium aphanidermatum*.

Tabela 6. Ação inibitória de extratos de diferentes linhagens contra *Pythium aphanidermatum*

Linhagens	Halo de inibição (mm)
Controle	25
CCMA 02	13,2
CCMA 04	4,8
CCAL 06	5,2
CCAL 10	5,6
CCMA 12	4,5
CCAL 29	3,5
CCMA20	4,0
CCMA27	9,00
CCMA*30	21,5
CCMA31	8,00
CCMA32	6,30
CCMA*33	19,50
CCMA 35	8,00
CCAL 39	12,0
CCMA41	5,00
CCMA 44	4,50
CCPL 46	3,50
CCMA 52	4,00
CCPL 53	8,60
CCAL 56.1	7,50
CCAL 56.2	8,00
CCPL 58	7,50
CCPL 60	6,50

*Controle – placa contendo somente o patógeno, *Pythium aphanidermatum*.

5.7 Estudos dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 30 e *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 33

5.7.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos foram submetidos a um minucioso estudo por cromatografia em camada delgada (CCD) com diferentes sistemas de solventes, na tentativa de otimização na separação dos compostos presentes. Em função de todas estas interações entre amostra/fase móvel/fase estacionária, o sistema foi otimizado para cada amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1990). Dos ensaios realizados em CCD os solventes que apresentaram melhor resolução foi a mistura de eluentes hexano/ acetato de etila/metanol (45:45:10) para a linhagem CCMA 30 e para a linhagem CCMA 33 os melhores solventes foram acetato de etila/metanol (90:10). O eluente usado para o desenvolvimento dos cromatogramas foi escolhido de acordo com as propriedades dos compostos químicos dos extratos. As manchas foram visualizadas sob luz ultravioleta ou aplicação de reveladores químicos (ninidrina sulfúrica, anisaldeído, ácido

fosfomolibdico, entre outros). Na técnica de CCD pôde-se constatar a presença no extrato em acetato de etila para a linhagem CCMA 30 de 8 “spots” e para a linhagem CCMA 33 a presença de 9 “spots” todas visíveis sob lâmpada UV nos comprimentos de onda a 254 nm e 366 nm e reveladas com dois tipos de reveladores químicos - anisaldeído e ácido fosfomolibdico - que resultaram em manchas muito intensas, indicando a alta concentração da substância detectada (Figura 14). Os “spots” dos respectivos extratos foram visualizados e suas distâncias de migração calculados (Tabela 7).

Tabela 7. Rfs das frações dos extratos visualizadas sob lâmpada UV com dois comprimentos de onda 254/366 nm.

Extratos	Rf 1	Rf 2	Rf 3	Rf4	Rf 5	Rf 6	Rf7	Rf 8	Rf 9
Controle	0,23	0,52	0,61	0,89					
CCMA 30	0,29	0,41	0,49	0,56	0,61	0,67	0,70	0,78	
CCMA 33	0,260	0,32	0,33	0,52	0,60	0,65	0,80	0,83	0,89



Figura 14. (A) Placa de CCD da linhagem CCMA 30 com 8 “spots” reveladas com anisaldeído (B) Placa de CCD da linhagem CCMA 33 com 9 “spots” reveladas com anisaldeído.

5.7.2 Bioautografia

Após a realização da técnica de CCD realizou-se a bioautografia, onde foram utilizados 2 fungos, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium oxysporium* e uma bactéria *Bacillus megatrium*

para que se observasse o halo de inibição sobre o composto visualizado na placa de cromatografia (esterilizada na luz ultravioleta por 1 h). Através de biomonitoramento com o fungo e a bactéria, verificou-se que a fração mais apolar apresentou atividade visivelmente contra *B. megaterium* (Figura 15) e também o fungo *Fusarium oxysporium*, porém em baixa intensidade. Os extratos aplicados na placa obtiveram os seguintes resultados (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados dos testes de bioautografia com os extratos CCMA 30 e CCMA 33 que apresentaram atividade antifúngica.

Extratos	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
CCMA 30	-	+	-
CCMA 33	-	-	+++

(-) sem atividade; (+) baixa intensidade, (+++) alta atividade

A bioautografia foi considerada um ensaio eficiente e sensível na determinação da atividade antimicrobiana, pois menos de 2,5 µg de substância utilizada foi suficiente para a formação do halo de inibição, pois a fração 9 (Rf 9) extraída com acetato de etila do extrato da linhagem CCMA 33 apresentou resultados positivos para *Bacillus megaterium* e a fração 7 (Rf 7) do extrato da linhagem CCMA 30 apresentou resultados positivos (baixa intensidade) ao *Fusarium oxysporium* em bioautografia.

Os dados apresentados não estabelecem a natureza dos compostos responsáveis pela ação antifúngica, porém estudos realizados com esta bactéria demonstram que a mesma é rica em compostos fenólicos e óleos fixos, substâncias que podem ser responsáveis pela ação verificada.

O método de bioautografia foi utilizado como bioprospecção, de forma a indicar o grupo de substâncias com atividade antimicrobiana presentes nos extratos da linhagem CCMA 30 e CCMA 33. O objetivo desta técnica foi identificar a fração que era responsável pela ação antimicrobiana. A bioautografia confirmou neste trabalho a sua praticidade, visto ser uma técnica que pode ser utilizada tanto para extratos de plantas como para substâncias isoladas, principalmente por ser um ensaio simples, confiável, eficiente e sensível, pois menos de 2,5 µg de substância bioativa formam áreas de inibição visíveis (PINTO et al., 2002).

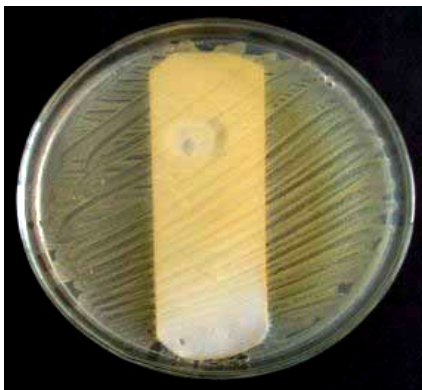


Figura 15. Bioautografia realizada com as frações obtidas pela CCD do extrato da linhagem CCMA 33, onde a fração com Rf 7 apresentou halo de inibição contra a bactéria, *Bacillus megaterium*.

5.7.3 Cromatografia em Coluna

O extrato bruto produzido pela linhagem de *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 33 foi fracionado em coluna de SEPHADEX-LH 20 (polímero gelatinoso), usando metanol. Das 26 frações obtidas de *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 33 fez-se cromatografia em camada delgada e estas foram agrupadas de acordo com a semelhança das frações; destas 10 frações mais o extrato bruto da linhagem CCMA 33 apresentaram compostos diferentes quando visualizadas em câmara UV e quando reveladas.

Do fracionamento em coluna de silicagel do extrato bruto produzido pela *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 30 apresentou 35 frações, dessas fez-se cromatografia em camada delgada e estas foram agrupadas de acordo com a semelhança das frações; 12 frações mais o extrato bruto da linhagem CCMA 33 apresentaram compostos diferentes quando visualizadas em câmara UV com comprimento de onda de 254 nm.

5.8 Concentração Mínima Inibitória das linhagens de *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 30 e CCMA 33

Em relação à avaliação da concentração mínima inibitória, algumas frações obtidas pela cromatografia em coluna e os extratos brutos apresentaram atividade significativa contra as linhagens de *Bacillus megaterium* e *Pythium aphanidermatum* demonstrando sensibilidade nas concentrações de 280 µg, 140 µg e 70 µg, com CMI de 70 µg/mL (Tabela 9).

Trabalho semelhante é relatado por Martins, Batista e Lopes (2006) verificando uma concentração mínima inibitória de 150 a 450 µg/ mL nos extratos de *Streptomyces* sp. T8,

endófito, isolado das folhas da planta medicinal *Symphytum officinale* contra as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cândida albicans*.

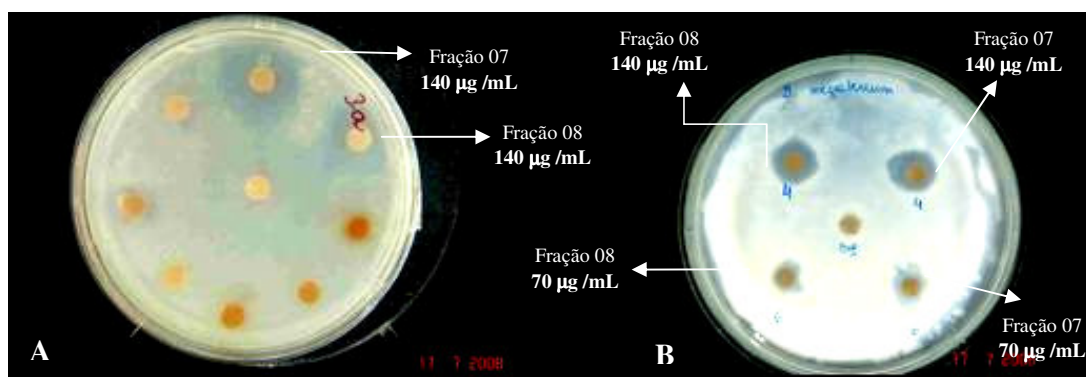
O extrato bruto da linhagem de *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 30 formou um halo de inibição contra bactéria Gram-positiva *B. megaterium* em todas as concentrações 280 µg, 140 µg e 70 µg, e no extrato bruto da linhagem de *Streptomyces griseorubiginosus* CCMA 33 também foi observado um halo de inibição em todas as concentrações. A bactéria *Bacillus megaterium* foi inibida pelos dois extratos brutos hidroalcolóicos das duas linhagens. Já as frações obtidas pela cromatografia em coluna dos extratos das duas linhagens, apresentaram bons resultados, como se pôde verificar na fração 5 da linhagem CCMA 30 a qual formou halo de inibição em todas as concentrações, porém na concentração 70 µg /mL apresentou fraca atividade. Na fração 7 e 8 da linhagem CCMA 33 verificou a presença de halos representativos contra a bactéria e o patógeno *Pythium aphanidermatum* (Figura 16).

A fração 5 da linhagem CCMA 30 apresentou atividade significativa nas concentrações de 280 µg e 140 µg. Já as outras frações dessa linhagem tiveram atividade somente na concentração de 280 µg /mL.

As frações 7 e 8 da linhagem CCMA 33 apresentou atividade nas concentrações de 280 µg /mL, 140 µg /mL e também atividade na concentração de 70 µg /mL, porém com baixa intensidade. Já as outras frações dessa linhagem tiveram atividade somente na concentração de 280 µg /mL.

Tabela 9. Avaliação da atividade biológica de frações frente ao *Pythium aphanidermatum*

Extrato bruto CCMA 30	11,3	7,5	6
CCMA 30 (1-2)	0	0	0
CCMA 30 (3)	0	0	0
CCMA 30 (4)	5,0	0	0
CCMA 30 (5)	7,6	3,5	1,9
CCMA 30 (6-12)	4,5	0	0
CCMA 30 (13-14)	6,5	0	0
CCMA 30 (15)	6,5	0	0
CCMA 30 (16-17)	0	0	0
CCMA 30 (18-20)	4,5	0	0
CCMA 30 (21-22)	4,8	0	0
CCMA 30 (23)	3,8	0	0
CCMA 30 (24-35)	5,4	1,9	0
Extrato bruto CCMA 33	11	10	8
CCMA 33 (1-6)	0	0	0
CCMA 33 (7)	8,2	6,9	2,0
CCMA 33 (8)	7,9	4,6	2,5
CCMA 33 (9)	4,3	0	0
CCMA 33 (10-11)	5,8	0	0
CCMA 33 (12-13)	3,8	0	0
CCMA 33 (14-15)	4,6	0	0
CCMA 33 (16-17)	0	0	0
CCMA 33 (18-21)	0	0	0
CCMA 33 (22-26)	3,5	2,3	0

**Figura 16.** (A) Atividade antimicrobiana da Fração 7 e 8 da linhagem CCMA 33 com a MIC de 140 µg/mL contra o patógeno *Pythium aphanidermatum*; (B) Atividade antimicrobiana da Fração 7 e 8 da linhagem CCMA 33 com a MIC de 140 µg/mL e 70 µg/mL contra *Bacillus megaterium*.

5.9 Perfis Químicos dos extratos brutos produzidos por Streptomyces griseorubiginosus linhagens CCMA 30 e CCMA 33

O estudo do perfil químico dos extratos por espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray foi realizado com o objetivo de determinar as massas moleculares dos principais metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias, o que possibilitou submetê-los a um estudo de derreplicação bem como fazer a comparação entre os perfis químicos e a diversidade metabólica desses extratos.

A inserção direta dos extratos brutos de microrganismos em um espectrômetro de massas operando com fonte de eletrospray pôde fornecer informações importantes sobre a composição das amostras, como o perfil de metabólitos secundários e as massas moleculares dos compostos presentes. Isso se deve ao fato de ser uma ionização branda que não provoca fragmentação, produzindo ions $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$. Esta metodologia tem possibilitado a criação de “bancos de dados” de massas moleculares dos metabólitos e tem sido usado na classificação quimiotaxonômica de microrganismos. Julian e colaboradores (1998) e Higgs e colaboradores (2001) utilizaram esta metodologia para estimar e diferenciar metabólitos secundários em extratos de microrganismos.

No perfil químico dos extratos bacterianos obtido por IES-MS, os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo e modo negativo. Porém, no modo negativo a ionização dos compostos não foi eficiente o que sugere que os compostos presentes no extrato apresentam caráter básico. Em vista disso foram apresentados os espectros de massas adquiridos no modo positivo. O fator que determina a eficiência da ionização é, principalmente, a estrutura química dos analitos. Substâncias que apresentaram grupamentos básicos, principalmente amina, carbonilas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo, dada a relativa facilidade com que as mesmas são protonadas. Por outro lado, substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas e, conseqüentemente, são analisadas em modo negativo. A natureza do solvente utilizado e o pH são igualmente importantes na geração de íons positivos e negativos. Íons positivos são geralmente analisados empregando-se soluções da amostra em metanol e com baixos valores de pH (CROTTI et al., 2006).

Para obtenção dos perfis químicos dos extratos brutos por espectrometria de massas, os extratos produzidos pelas linhagens CCMA 30 e CCMA 33 foram dissolvidos em metanol/acetato de amônio 0,1% (1:1) com concentração final de 200 µg/mL e introduzidas no equipamento por inserção direta via HPLC (sem coluna). Desta forma, todos os compostos

presentes nos extratos puderam ser observados, uma vez que não ocorre retenção na coluna cromatográfica. Os espectros foram adquiridos no modo *full scan* (IES-EM) tanto no modo positivo como no modo negativo.

As Figuras abaixo apresentam os espectros de massas no modo *full scan* dos extratos brutos das actinobactérias CCMA 30 (Figura 17) e CCMA 33 (Figura 18), identificadas como *Streptomyces griseorubiginosus*, cultivadas em meio BD por um período de 08 dias.

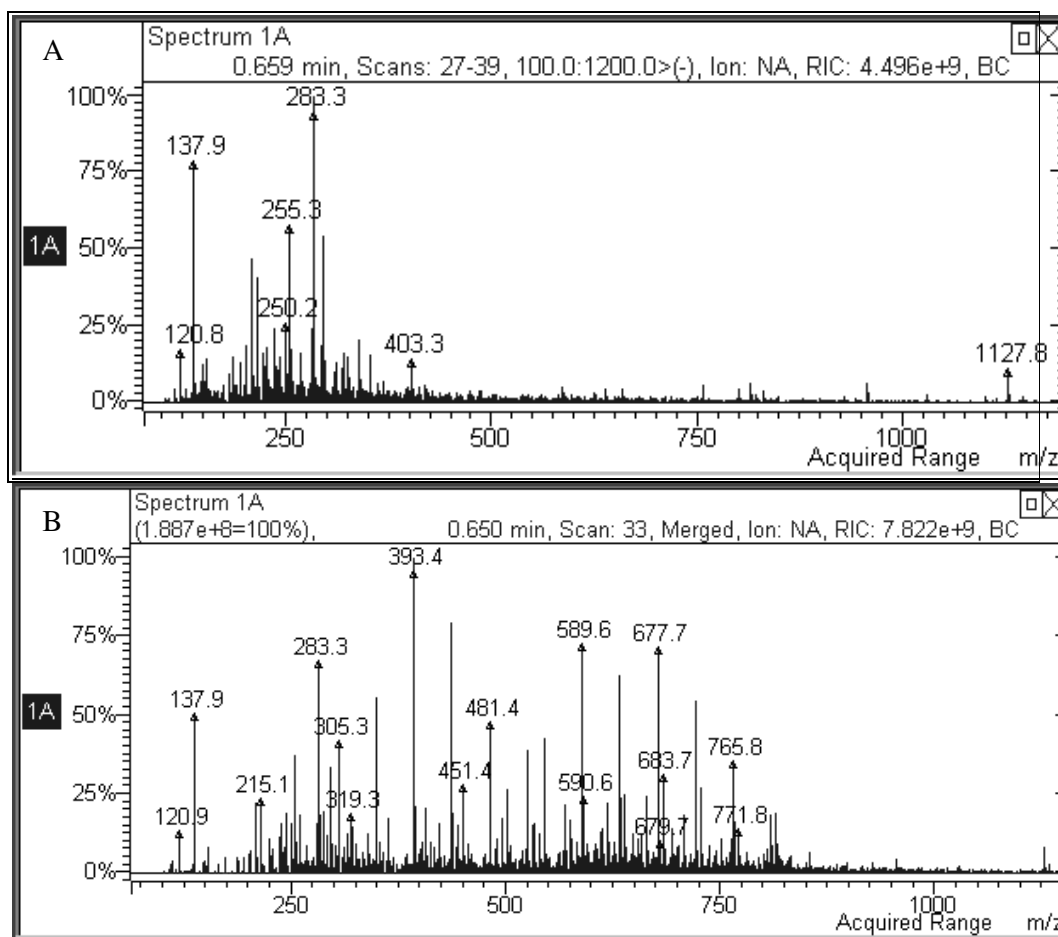


Figura 17. A) Espectros de massas IES- do extrato bruto da linhagem CCMA 30 e B) Espectros de massas IES+ do extrato bruto da linhagem CCMA 30.

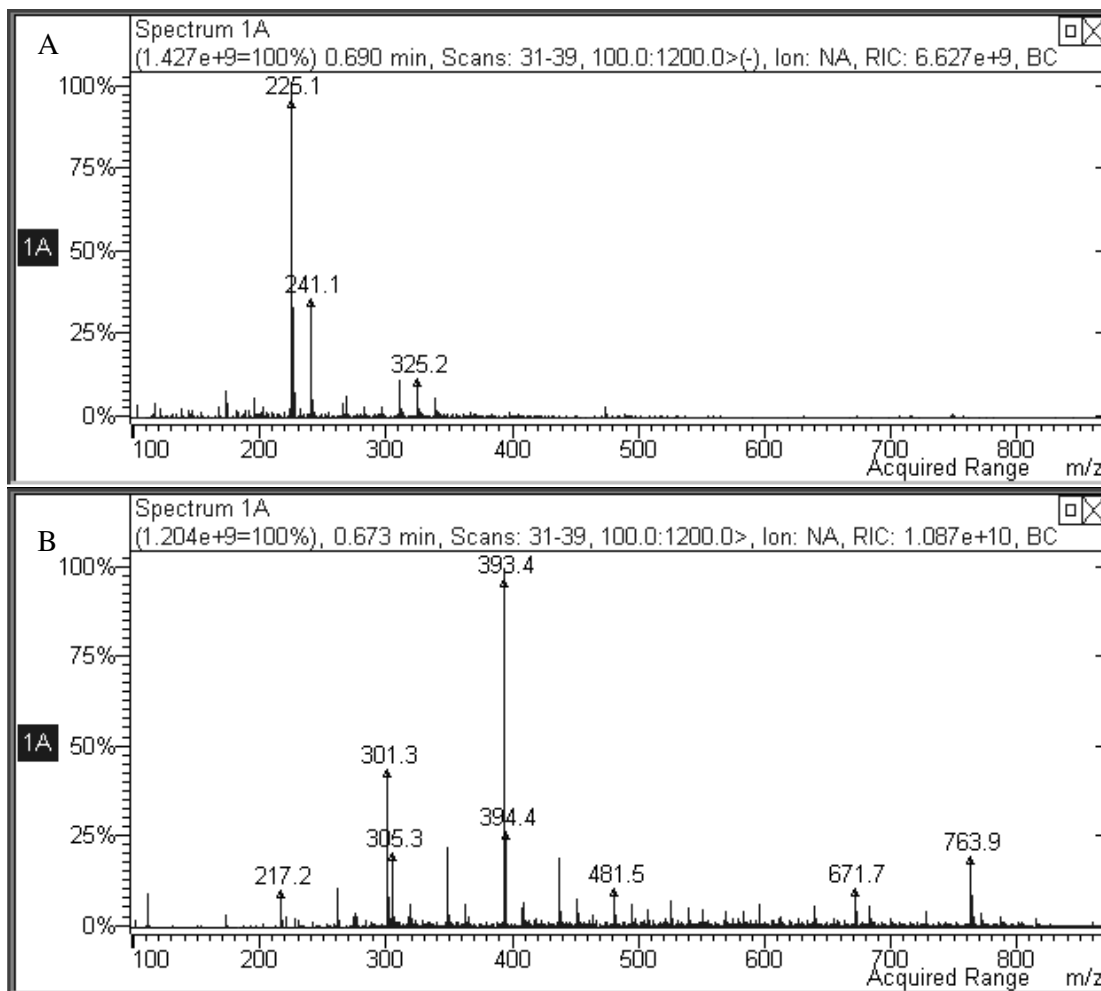


Figura 18. A) Espectros de massas IES⁻ do extrato bruto da linhagem CCMA 33 e B) Espectros de massas IES⁺ do extrato bruto da linhagem CCMA 33.

Observou-se nos espectros acima que ambos os extratos das linhagens CCMA 30 e CCMA 33, com ionização em modo negativo (IES⁻) apresentaram poucos sinais, o que indica o caráter menos ácido dos compostos presentes. Os perfis químicos dos extratos brutos observados apresentaram pouca similaridade, uma vez que somente alguns sinais presentes no intervalo de m/z 390 a 500 possuíam massas coincidentes.

Visando a complementação do estudo de perfil químico por espectrometria de massas, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência também foi utilizada. Para isso, várias condições foram testadas, com o objetivo de se obter a melhor separação dos compostos (CASS e DEGANI, 2001). A condição que apresentou a melhor separação está representada na Tabela 10. As Figuras 19 e 20 apresentam os cromatogramas dos extratos brutos das bactérias CCMA 33 e CCMA 30, respectivamente.

Tabela 10. Gradiente das fases móveis (acetonitrila e água) utilizadas no desenvolvimento do método cromatográfico (CLAE).

Tempo (minutos)	Acetonitrila (ACN)	H ₂ O
0,01	20	80
0,5	20	80
40	60	40
50	90	10
55	90	10
55,1	0	0

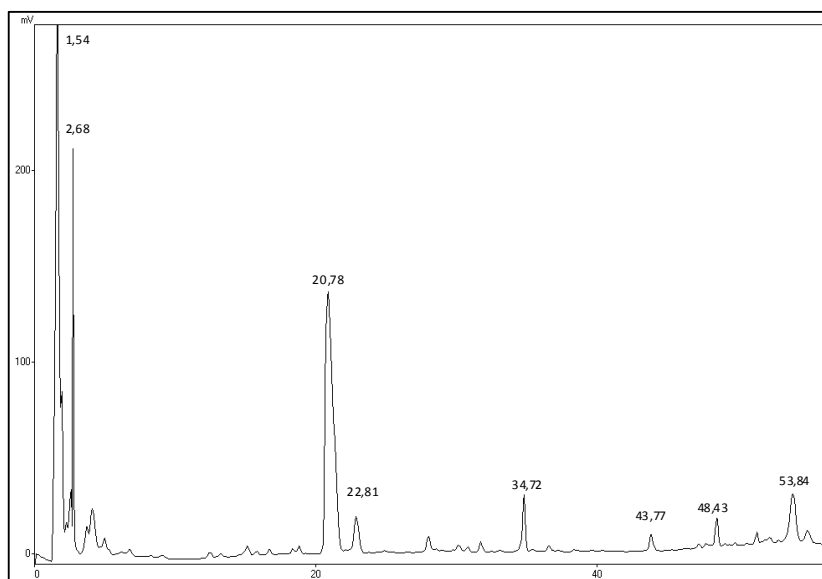


Figura 19. Cromatograma do extrato bruto da linhagem CCMA 33 com tempos de retenção dos picos que apresentaram intensidade.

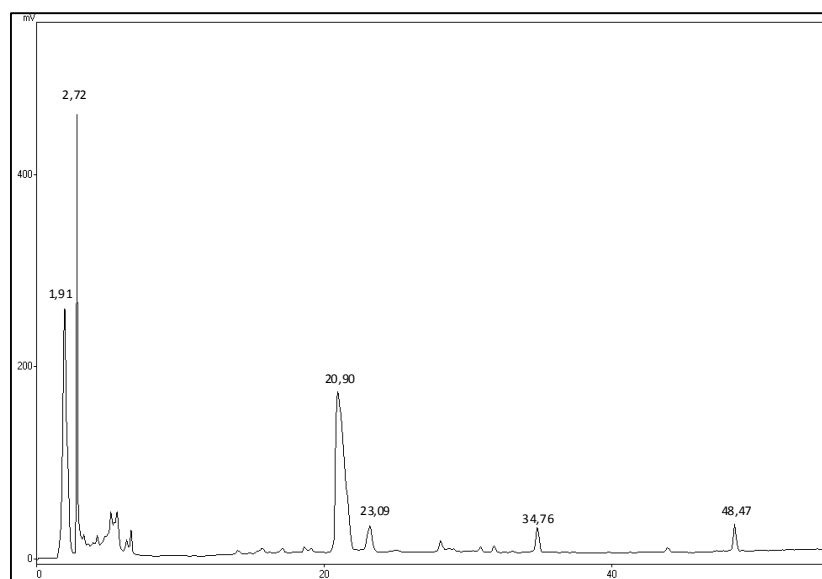


Figura 20. Cromatograma do extrato bruto da linhagem CCMA 30 com tempos de retenção dos picos que apresentaram intensidade.

Como pôde ser observado nas figuras acima, o cromatograma do extrato bruto da actinobactéria CCMA 33 apresentou um grande número de picos quando comparado com o perfil encontrado para o extrato da actinobactéria CCMA 30, o que indica a presença de um maior número de compostos. Esses resultados confirmam o perfil químico observado nos experimentos utilizando a espectrometria de massas, que evidenciaram sua maior diversidade de compostos.

5.9.1 Fracionamento do extrato bruto CCMA 30 e CCMA 33 e identificação da fração ativa

Após a otimização do período de fermentação para a produção máxima de metabólitos com atividade antifúngica através do bioensaio com *Pythium aphanidermatum* a escala de fermentação em meio líquido foi aumentada para 6 L. O objetivo desta etapa foi aumentar a quantidade de extrato bruto para o processo de ensaio biológico, isolamento e caracterização do composto bioativo.

Após o período de incubação, os metabólitos do meio foram extraídos com acetato de etila, conforme item 4.7 produzindo uma massa total de 210 mg de extrato bruto para a linhagem CCMA 30 e uma massa total de 140 mg de extrato bruto para a linhagem CCMA 33.

A partir do fracionamento do extrato bruto da linhagem CCMA 33 por cromatografia em coluna de sephadex LH 20, tendo como eluente metanol, foram obtidas 26 frações cromatográficas, as quais foram agrupadas por cromatografia em camada delgada. Em seguida, estas foram secas em rota-evaporador sob pressão reduzida. As frações reunidas foram submetidas a um novo bioensaio com *Pythium aphanidermatum*, onde obteve-se duas frações ativas fração 7 e fração 8.

O extrato bruto da linhagem CCMA 30 foi fracionado por cromatografia em coluna de silicagel com fases móveis com ordem crescente de polaridade, obtendo 26 frações cromatográficas, agrupadas por CCD. Em seguida, estas foram secas em rota-evaporador sob pressão reduzida. As frações reunidas foram submetidas a um novo bioensaio com *Pythium aphanidermatum*, onde a fração 5 apresentou maior atividade.

As frações que apresentaram atividade antifúngica foram analisadas por IES+, para obtenção do perfil químico. Como observado nos espectros de massas, as frações 7 e 8 da linhagem CCMA 33 apresentam um bom grau de pureza (Figura 21). Outro fato interessante

foi a presença dos sinais na região de m/z 719-768. A semelhança de sinais pode estar relacionada aos metabólitos ativos presentes nas duas frações (Figura 22).

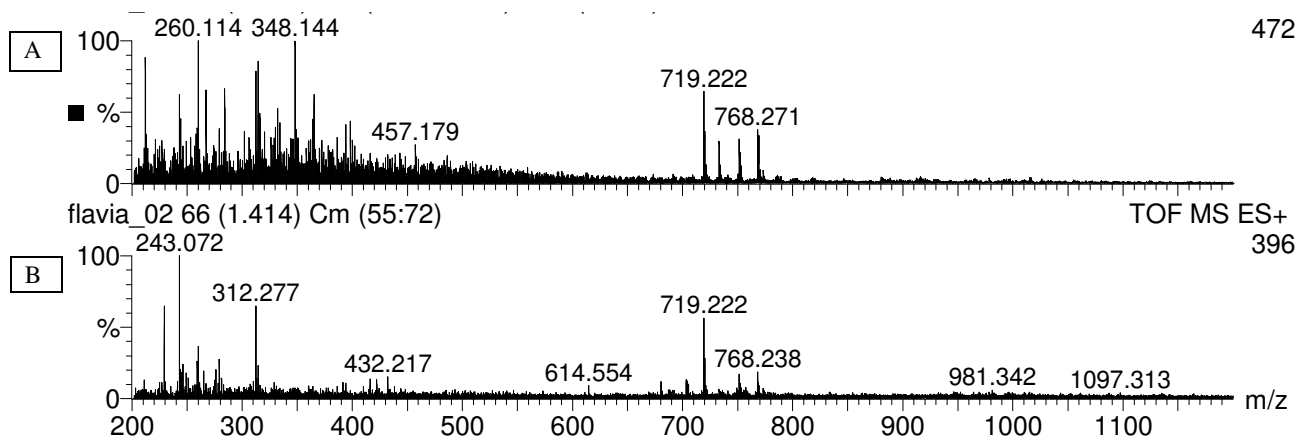


Figura 21. (A) Espectro de massas da fração 7 (CCMA 33) utilizando a fonte de ionização por eletrospray, em modo positivo (IES +). (B) Espectro de massas da fração 8 (CCMA 33) utilizando a fonte de ionização por eletrospray, em modo positivo (IES +).

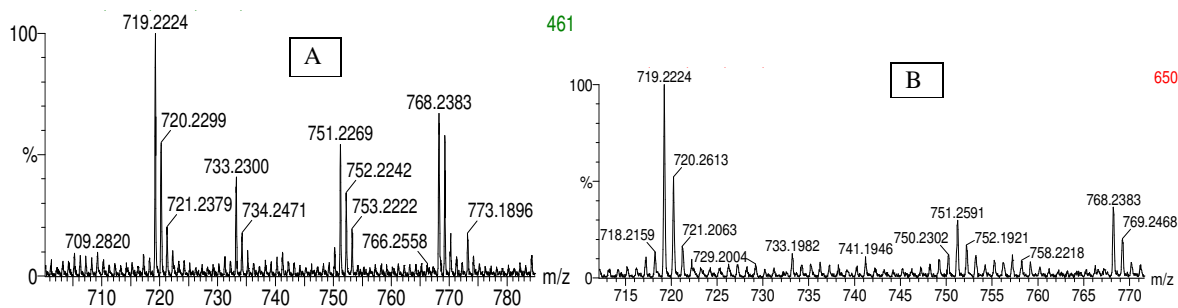


Figura 22. A) Ampliação da região de sinais que apresentaram maior intensidade na fração 7 e B) Região de sinais que apresentaram maior intensidade na fração 8.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada para obtenção de mais informações dos compostos presentes nas frações, visando a complementação do estudo de perfil químico por espectrometria de massas. As Figuras abaixo apresentam os cromatogramas CLAE-UV das frações ativas 7 (Figura 23) e 8 da linhagem CCMA 33 (Figura 24). Pelos cromatogramas foi possível observar a relativa pureza das frações. Também foi possível observar que as frações 7 e 8 são semelhantes, uma vez que apresentam os picos cromatográficos com o mesmo tempo de retenção.

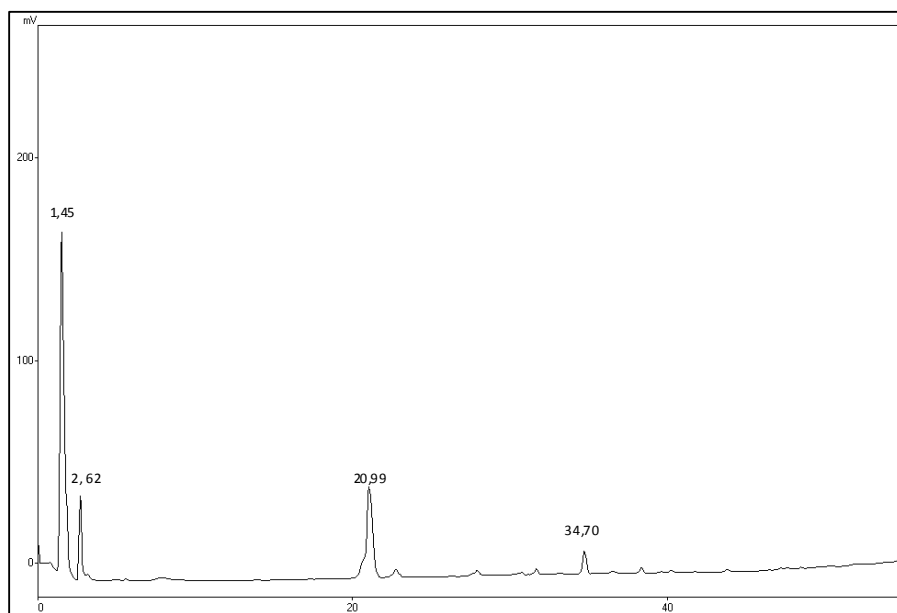


Figura 23. Cromatograma da fração 7 com tempos de retenção dos picos com maior de intensidade.

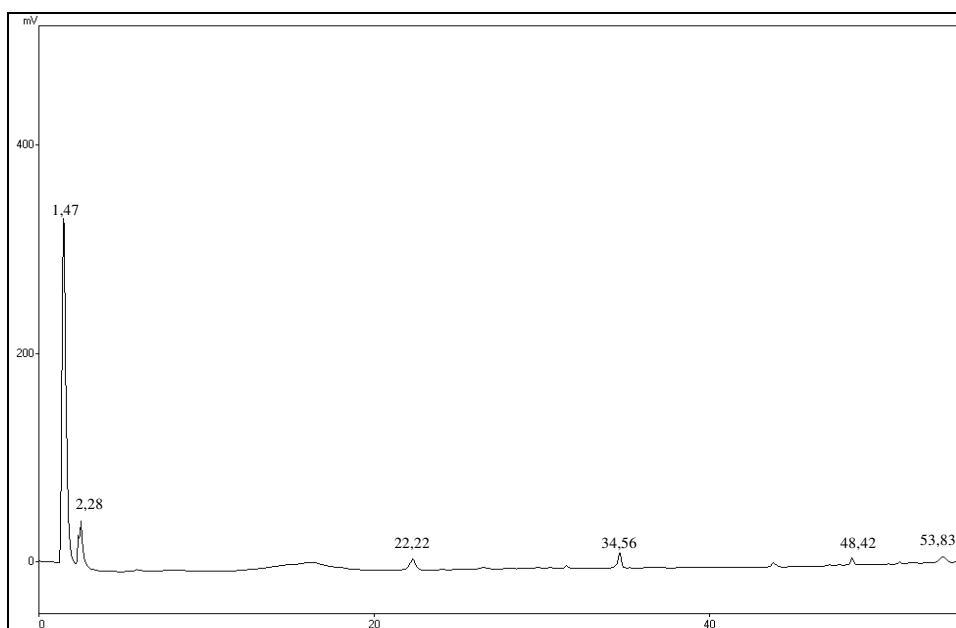


Figura 24. Cromatograma da fração 8 com tempos de retenção dos picos com maior de intensidade

Para a fração 05 foi realizado um estudo comparativo utilizando a espectrometria de massas em modo positivo e negativo (IES+ e IES-) com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 25).

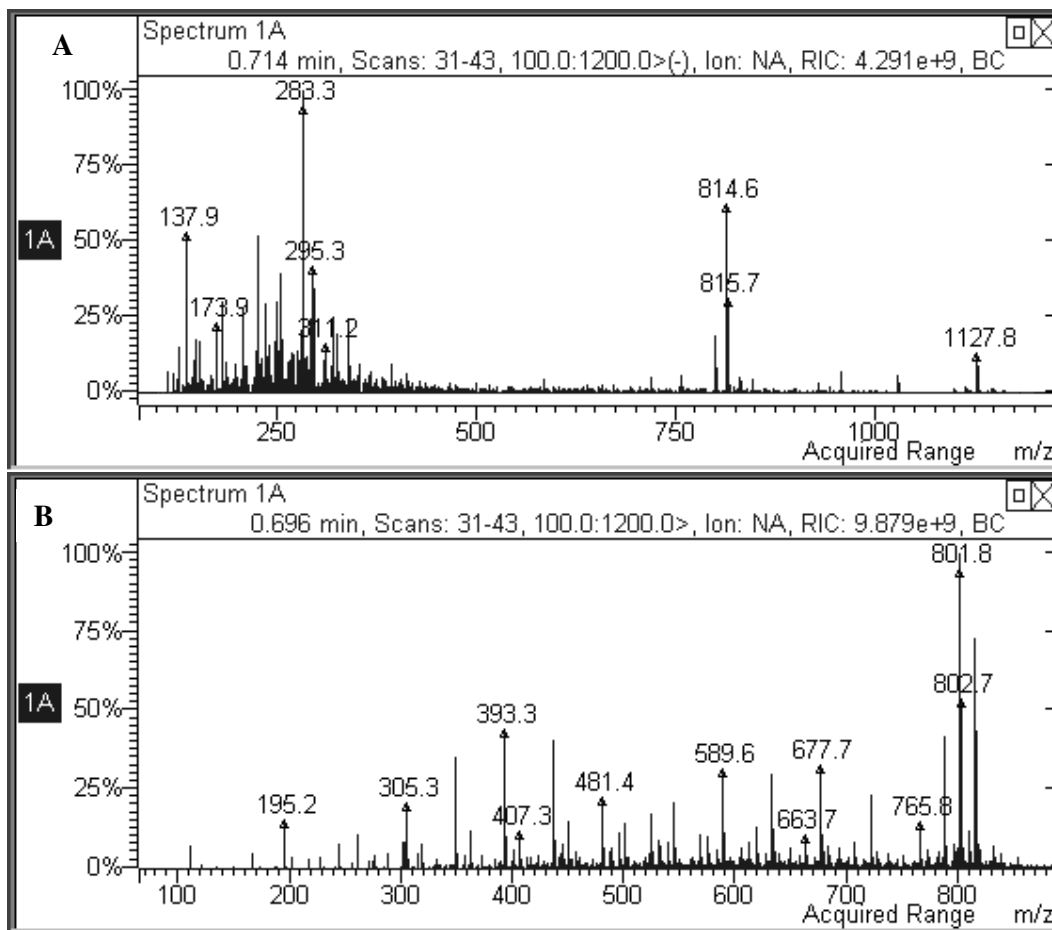


Figura 25. (A) Espectro de massas da fração 5, linhagem CCMA 30 em modo negativo (IES-), (B) Espectro de massas da fração 5, linhagem CCMA 30 em modo positivo (IES+).

Os espectros de massas acima confirmam o caráter básico da fração 5 já observado na análise do extrato bruto da linhagem CCMA 30, uma vez que a fração apresentou melhor ionização em modo positivo, revelada pelo maior número de sinais observados. Foi também possível afirmar que a fração não está pura, sendo esta informação confirmada pelos cromatogramas (Figura 26).

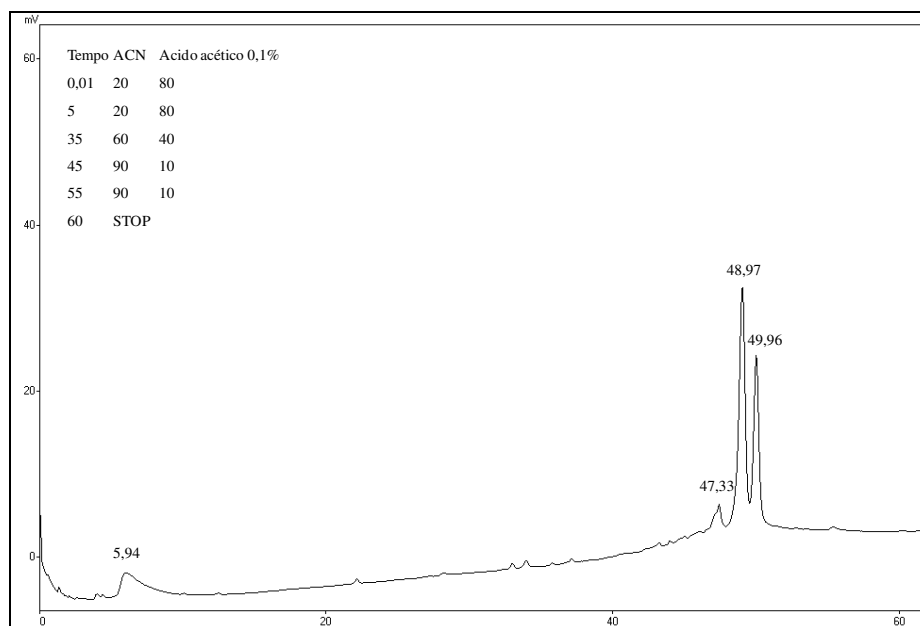


Figura 26. Cromatograma da fração 5 com tempos de retenção dos picos com maior intensidade.

5.9.2 Derreplicação dos Extratos das Actinobactérias

A derreplicação além de acelerar o estágio de descoberta de novas substâncias com atividade biológica, e de compostos já caracterizados, apresenta de forma sucinta todas as suas atividades biológicas descritas (CORDELL et al., 1997).

As análises de derreplicação estão atualmente muito bem estabelecidas no âmbito da pesquisa em produtos naturais, devido a sua versatilidade, rapidez, confiabilidade e reprodutibilidade na análise de extratos brutos, de maneira a prover uma rápida priorização de extratos e substâncias a serem isoladas, evitando-se o re-isolamento de substâncias já conhecidas. Na verdade, atualmente se considera que a derreplicação constitui uma etapa absolutamente essencial na descoberta de produtos naturais bioativos estruturalmente inéditos. (VANMIDDLESWORTH e CANNELL, 1998).

A primeira busca foi realizada por compostos produzidos pelo microrganismo de interesse, *Streptomyces griseorubiginosus* já existentes na literatura. Nesta busca foram encontrados 15 compostos, e suas massas moleculares foram comparadas com as presentes nos espectros de massas (Tabela 11).

Tabela 11. Buscas por compostos produzidos por *Streptomyces griseorubiginosus* existentes na literatura.

Compostos	Massa Exata
Alnumycin	416.14712
Alnumycin; 7-Methoxy	446.157685
Antibiotic K 802-4	372.08452
Biphenomycin A	488.190716
Biphenomycin A; 7-Deoxy	472.195801
Biphenomycin C	731.323856
Cinerubin A	827.336439
Cinerubin B	825.320789
3,8-Dihydroxy-1-propylanthraquinone-2-carboxylic acid	326.07904
Ochromycinone; (S)-form, Me ether	320.10486
Reducomycin	293.089939
Rubiginone A1	338.115425
Rubiginone A1; 4-Deoxy	322.12051
Rubiginone A1; 1-Ketone, 4-O-(2-methylpropanoyl)	406.14164
Rubiginone A1; 4-O-(2-Methylpropanoyl)	408.15729

Nessa busca pelos compostos produzidos pelo microrganismo, *Streptomyces griseorubiginosus* não foram encontradas massas coincidentes com as presentes nas frações ativas. Sendo assim, novos experimentos foram necessários, como o estudo de espectrometria de massas sequencial (MS/MS), para a obtenção de mais informações estruturais dos compostos.

Baseado no perfil químico das frações ativas foi possível observar que o grupo de sinais presentes na região m/z 719-768 podiam estar relacionados com a atividade biológica, sendo então submetidos a experimentos de MS/MS (fragmentação induzida por colisão), com objetivo de se obter informações estruturais que pudessem indicar a classe química dos respectivos metabólitos, além de auxiliar nas buscas nos bancos de dados. Os espectros de MS/MS estão apresentados na figura 27.

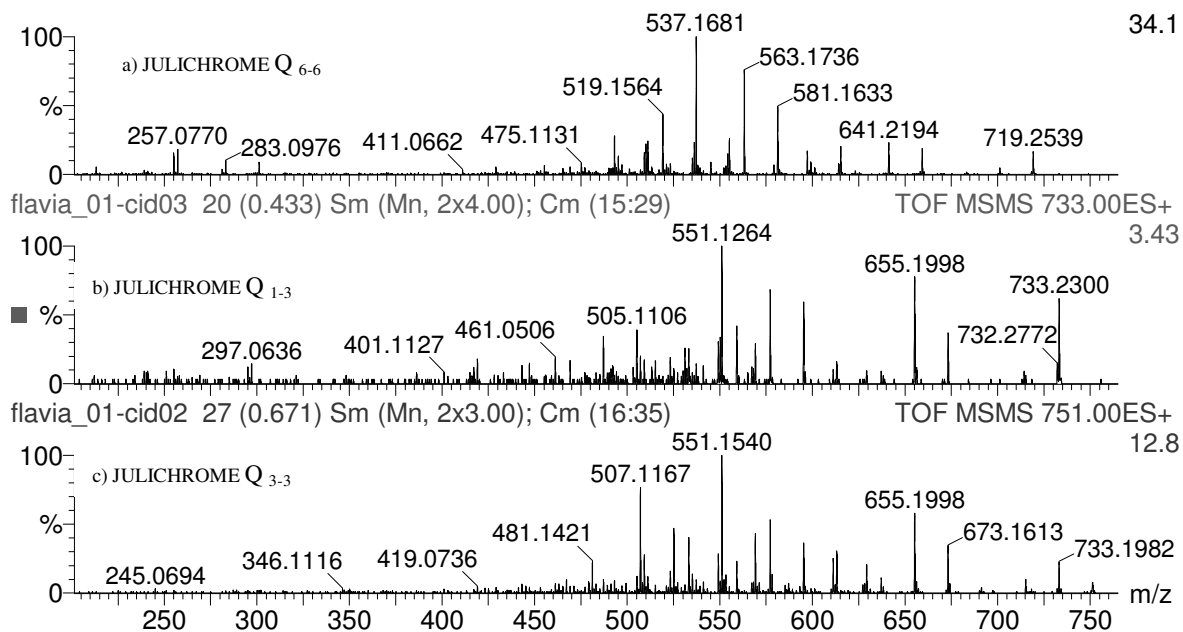


Figura 27. Espectros de MS/MS a) íon de m/z 719 , b) m/z 733 e c) m/z 751 presentes na fração 7 da linhagem CCMA 33.

Nos espectros acima foi possível observar grande semelhança dos perfis de fragmentação dos íons de m/z 719, 733 e 751, o que indica que são pertencentes à mesma classe química. Foram observados algumas perdas características como H_2O $[\text{M}+\text{H}-18 \text{ DA}]^+$, MeOH $[\text{M}+\text{H}-32 \text{ DA}]^+$ e AcOH $[\text{M}+\text{H}-60 \text{ DA}]^+$.

O próximo passo consistiu em uma nova busca por compostos com massas moleculares no intervalo de 718 – 719. Foram encontrados 72, sendo que somente 4 compostos são produzidos por actinobactérias do gênero *Streptomyces* e os demais apresentaram diversas fontes biológicas como bactérias, plantas e esponjas. Independente da fonte biológica, todos os compostos foram analisados. Para os compostos produzidos por actinobactérias a busca foi mais criteriosa, por terem sido isolados de microrganismos do mesmo gênero estudado.

Nesta busca foi identificada como um dos compostos presentes nas frações ativas a Julichrome Q₆₋₆ 10` dihidroxi ($\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{O}_{14}$). Este composto pertence à classe das antraquinonas e foi primeiramente isolado de *Streptomyces shiodaensis*.

Novas buscas na literatura e em bancos de dados revelaram a existência de uma série homóloga composta por 20 bisantraquinonas (Tabela 12) sendo possível caracterizar mais duas Julichromes presentes nas frações ativas. As substancias encontradas foram Julichrome Q₁₋₃ ($\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$) e Julichrome Q₃₋₃ ($\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{O}_{16}$) (Figura 28).

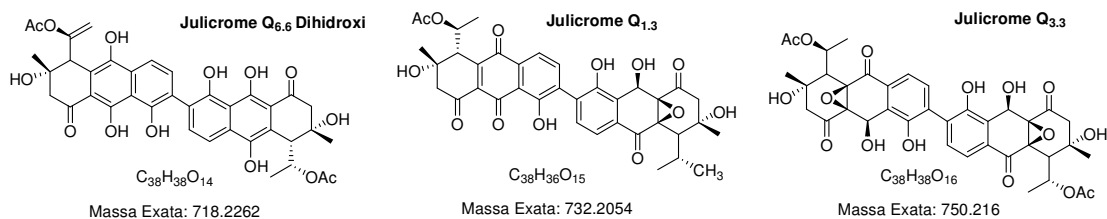


Figura 28. Estruturas das Julichromes encontradas na fração 7 da linhagem CCMA 33.

Tabela 12. Resultado das buscas pelas julichromes já caracterizadas na literatura.

Nome	Massa Molecular
Julichrome Q _{5,5}	590,12
Julichrome Q _{2,5}	634,15
Julichrome Q _{5,6}	638,18
Julichrome Q _{1,5}	652,16
Julichrome Q _{3,5} ; 10 – cetona	668,15
Julichrome Q _{3,5}	670,17
Julichrome Q _{2,2}	678,17
Julichrome Q _{6,6}	686,24
Julichrome Q _{1,2}	696,18
Julichrome Q _{1,6}	700,21
Julichrome Q _{1,3} ; 9 – cetona	730,20
Julichrome Q _{1,1}	714,19
Julichrome Q _{2,3}	714,19
Julichrome Q _{6,6} ; 10, 10' - dihidroxi	718,23
Julichrome Q _{1,3}	732,20
Julichrome Q _{1,3} , 4a, 9a – Diepímero	732,20
Julichrome Q _{3,8}	734,22
Julichrome Q _{3,3} ; 9 – cetona	748,20
Julichrome Q _{3,3}	750,21
Julichrome Q _{1,9}	746,28

As julichromes são bisantraquinonas abundantes na natureza, sendo encontradas em fungos, líquens e nas Angiospermas, principalmente nas Rubiáceas, Fabáceas, Polygonáceas, Rhamnáceas, Liliáceas e Escrofulariáceas. As Julichromes são estruturas químicas e de configurações octacíclicas (KANZAKI et al., 1993).

Essa classe de composto apresenta importantes atividades terapêuticas, citotóxicas e propriedade antimicrobianas, incluindo atividade contra MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e vancomicina e atividade contra *Enterococcus faecalis* resistente e produzem efeitos citotóxicos contra células HCT-116 existentes. Algumas bisantraquinonas, como as Julichromes Q₆₋₆, 10-10'-dihydroxi (Figura 29), inibem o crescimento de bactérias Gram – positivas incluindo as linhagens que são resistentes a antibióticos e apresentam atividade citotóxica contra células tumorais (SINGH et al., 2007).

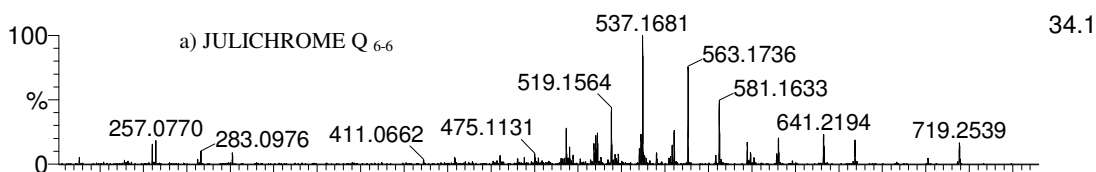


Figura 29. Espectro de MS/MS do íon de m/z 719, confirmando a presença da Julichrome Q₆₋₆, na fração ativa.

No espectro acima, foi possível confirmar a perda de 60 Da, que são características da classe das Julichromes contendo o ácido acético (AcOH) (MARTINEZ 2009).

Alguns estudos mostraram que a Julichrome Q_{1,3}, produzida pela linhagem de *Streptomyces* sp. TM-71 é capaz de inibir a formação de galhas sem afetar a germinação de sementes alfafa. Este composto foi submetido ao bioensaio de discos de batata (*Potato tuber disk assay*), para a quantificação desta inibição, e os resultados apresentaram inibição mínima na concentração de 1,6 $\mu\text{g. disco}^{-1}$. Além disso, o composto não causa necrose em concentrações inferiores a 100 $\mu\text{g. disco}^{-1}$ e tão pouco causa a inibição da germinação de sementes de alfafa em concentrações inferiores a 50 $\mu\text{g. disco}^{-1}$, além de não exibir atividade contra *Agrobacterium tumefaciens*. Estes dados demonstraram que o composto é especificamente ativo em qualquer uma das etapas da formação da planta, sem afetar suas células ou o crescimento de *A. tumefaciens*, sendo promissor na investigação da elucidação dos mecanismos de transformações de plantas (KANZAKI et al., 1993).

Uma vez as Julichromes caracterizadas, novos estudos de derreplicação foram realizados com objetivo de encontrar outros compostos presentes nas frações ativas. Os íons de m/z 260 e m/z 312 foram submetidos ao estudo de fragmentação (MS/MS) (Figura 30).

Como pode ser observado no espectro de massas, os perfis de fragmentação não foram semelhantes entre si e entre os demais compostos já apresentados, o que indica não pertencer à mesma classe química.

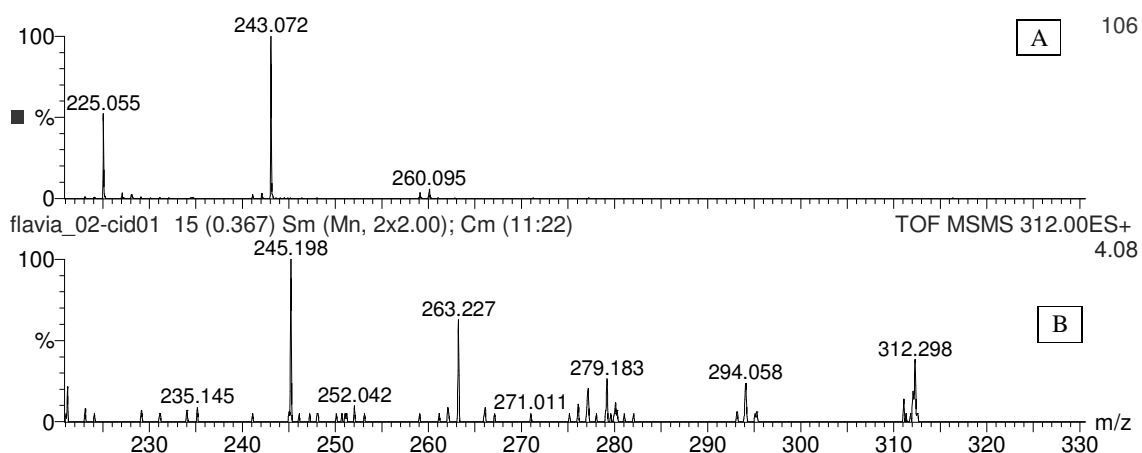
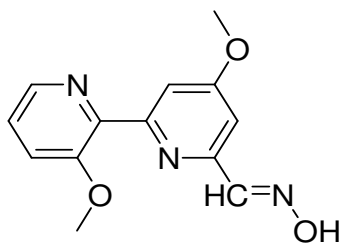


Figura 30. (A) Perfis de fragmentação dos íons m/z 260 presentes na fração 8 da linhagem CCMA 33. (B) Perfis de fragmentação dos íons m/z 312 presentes na fração 8 da linhagem CCMA 33.

Algumas buscas em bancos de dados foram realizadas, baseadas nas massas moleculares dos compostos encontrados. São sugeridos neste trabalho a identificação dos compostos de m/z 260 como caerulomicina ($C_{13}H_{13}N_3O_3$) e para o sinal de m/z 312 como Staurosporinona ($C_{20}H_{13}N_3O$), porém as confirmações estruturais obtidas por experimentos de ressonância magnética nuclear e outras buscas na literatura ainda serão necessárias para a confirmação dos mesmos.

As caerulomicinas, possível substância presente na fração ativa, são conhecidas como antibióticos biperidínicos, as quais já foram isolados em 1959. As Caerulomicinas são uma das cinco caerulomicinas produzidas por *Streptomyces caeruleus*. Esse composto apresenta propriedade biológica de grande interesse, incluindo atividade contra fungos, leveduras e contra *Entamoeba histolytica* (FUNK and DIVEKAR, 1959). Sua estrutura está apresentada na figura abaixo.



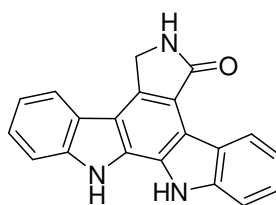
Caerolumicina

Massa exata: 259, 0957

Figura 31. Estrutura química da Caerolumicina ($C_{13}H_{13}N_3O_3$), possível composto presente na fração ativa.

Outra substância encontrada foi a Staurosporina, um importante alcalóide bioativo isolado originalmente em 1977. Foi o primeiro dos 50 alcalóides isolados com estrutura química do tipo bis-indole. Esse composto é produzido principalmente por *Streptomyces staurosporeus*, *Streptomyces longisoroflavus* (R19) e *Streptomyces mediocidicus* (ATCC 13279). Relativamente esse composto não é seletivo e apresenta grande potencial de atividade contra fungos, no tratamento anti-cancer, tem inibição de proteína Kinase e indução de apoptoses (RUEGG and BURGESS, 1989).

Como a porção heterocromática é subunidade comum em outros alcalóides indolocarbazoles relacionados estruturalmente, muitas sínteses tem sido descritas para essas substâncias desde a determinação da estrutura. Sua estrutura está apresentada na figura a seguir.



Staurosporina

Massa exata: 311, 1059

Figura 32. Estrutura química da Staurosporinona ($C_{20}H_{13}N_3O$), possível composto presente na fração ativa.

5.9.3 Subfração ativa analisada por RMN (Ressonância Magnética Nuclear)

A fração 7 foi re-purificada por cromatografia em coluna de silicagel com fases móveis com ordem crescente de polaridade, obtendo 22 frações cromatográficas, agrupadas por CCD. Em seguida, estas foram secas em rota-evaporador sob pressão reduzida. As subfrações reunidas foram submetidas a um novo bioensaio com *Pythium aphanidermatum*, onde a subfração 16 apresentou maior atividade.

A fração 8 também foi re-purificada em cromatografia de coluna de silicagel com fases móveis com ordem crescente de polaridade, obtendo 16 frações cromatográficas, agrupadas por CCD. Em seguida, estas foram secas em rota-evaporador sob pressão reduzida. As subfrações reunidas foram submetidas a um novo bioensaio com *Pythium aphanidermatum*, onde não se observou atividade. Isso se deve ao fato de existir pouca quantidade de amostra obtida pela cromatografia em coluna, não sendo possível, portanto, novos bioensaios para verificação de atividade.

A subfração 16 (8 mg) presente na fração ativa 7 da linhagem CCMA 33, foi submetida a análise de RMN de ^1H , gHSQC e gHMBC.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 33) da subfração 16 apresentou 5 sinais, 1°) em 0,75 ppm (triplete $J=6,75\text{ Hz}$) que corresponde a uma metila (CH_3), 2°) entre 1,10 a 1,25 ppm (*multipleto*) com 4 hidrogênios (integral), ou seja, dois grupos metilênicos (2 CH_2 a - b), 3°) em 1,38 ppm apresentando um *multipleto*, também correspondente a um metileno (CH_2), 4°) em 2,10 ppm apresentando um *singleto* largo (CH_2) e em 5°) um *singleto* em uma região de 5,79 ppm, referente a um hidrogênio olefínico (CH).

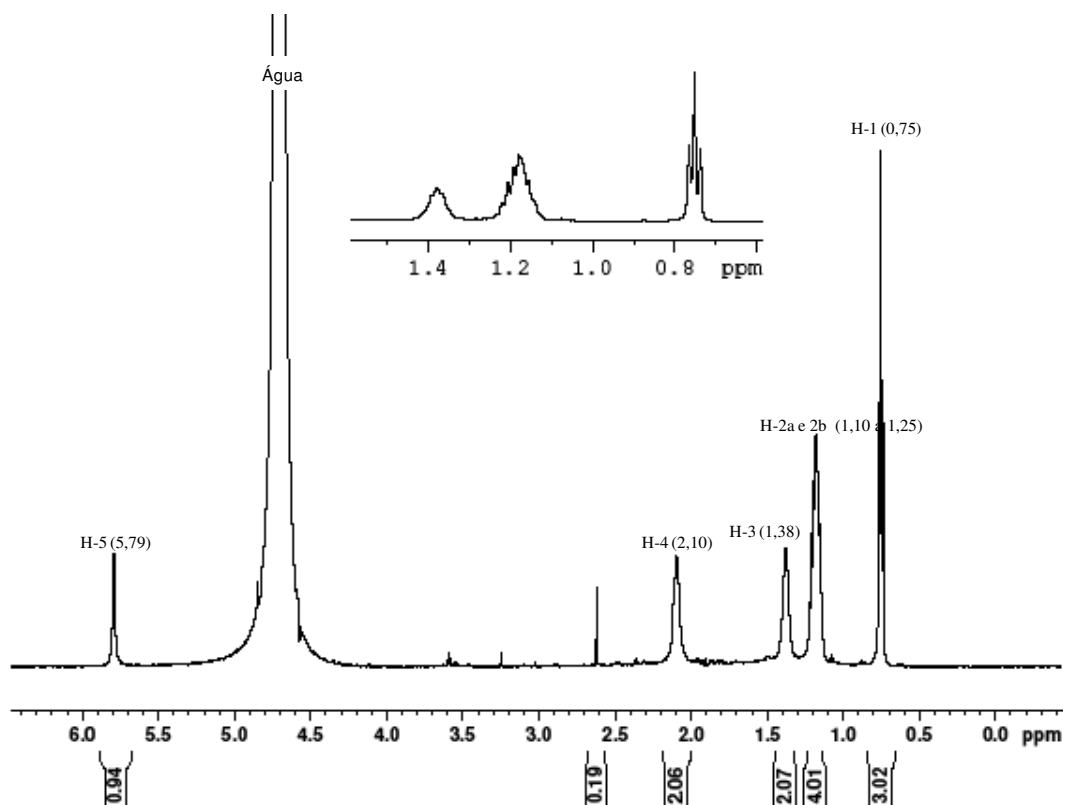


Figura 33. Espectro de RMN de ¹H da subfração 16 dissolvida em D₂O.

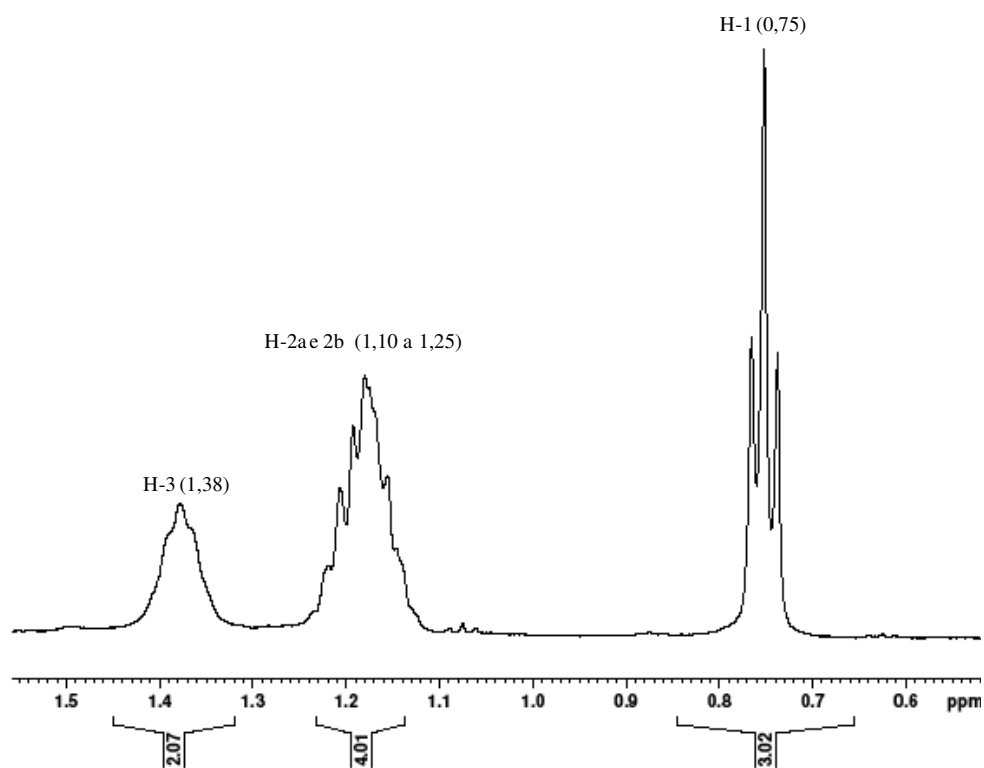


Figura 34. Ampliação do espectro de RMN de ¹H da subfração 16 dissolvida em D₂O.

O espectro de gHSQC, o qual apresenta correlações de hidrogênios ligados a carbonos ($^1J_{C-H}$) apresentou os seguintes resultados (Figura 35):

- Hidrogênio na região de 0,75 ppm ligado ao carbono com deslocamento químico em 13,5 ppm;
- Quatro hidrogênios do *multiplete* (2 CH₂) na região entre 1, 10 a 1,25 ppm ligados aos carbonos em 22,0 e 31,5 ppm;
- O grupo metileno (CH₂) com deslocamento químico em 1,38 ppm ligado ao carbono em 27,5 ppm;
- hidrogênio na região de 2,10 ppm ligado ao carbono com deslocamento químico em 20,5 ppm;
- hidrogênio olefínico na região de 5,79 ppm ligado ao carbono com deslocamento químico em 108 ppm.

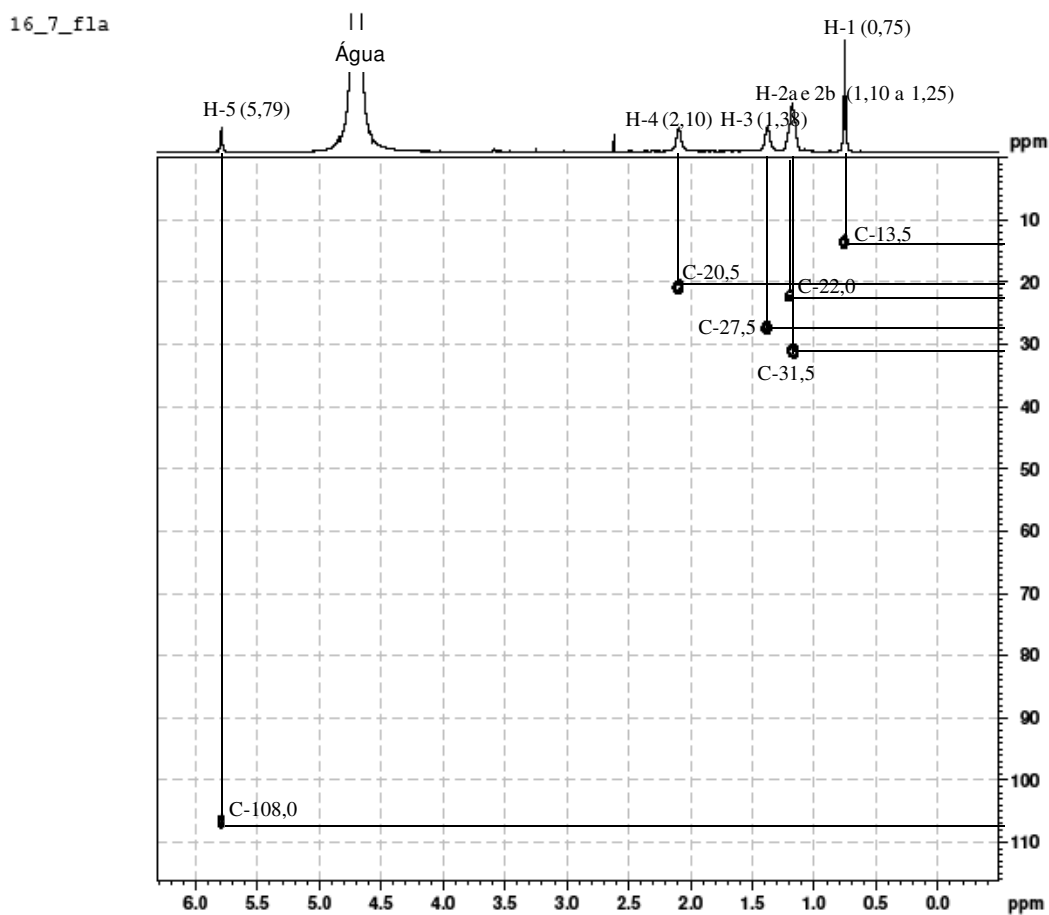


Figura 35. Espectro de gHSQC da subfração bioativa 16 da actinobactéria CCMA 33, solubilizada e D₂O.

O espectro de gHMBC ^1H - ^{13}C , que correlaciona hidrogênios ligados a carbonos através de 2, 3 ou 4 ligações (2J , 3J , 4J) apresentou os seguintes resultados (Figura 36):

- Metila (CH_3) correlacionada aos carbonos em 22,0 e 31,5 ppm,
- Os hidrogênios denominados de 2 a e 2 b pertencentes ao *multiplete* (2 CH_2), correlacionam com o carbono da metila em 3,5 ppm.

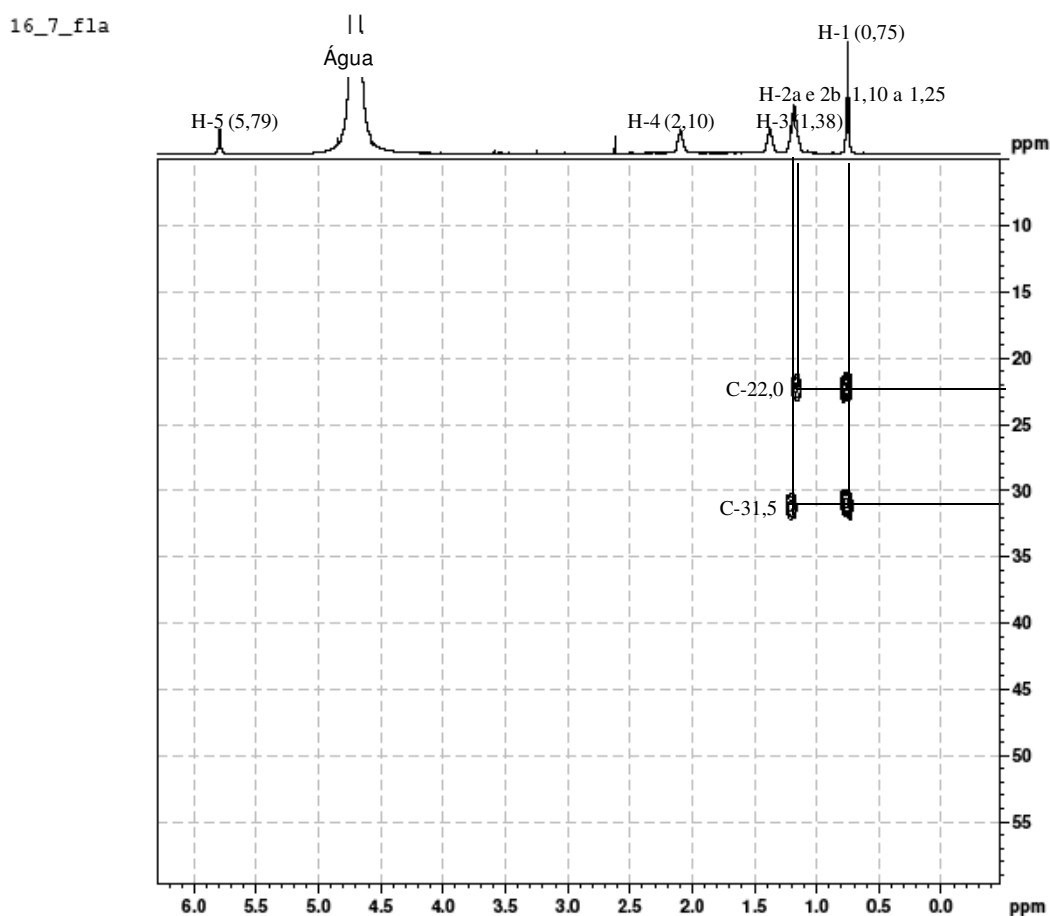


Figura 36. Espectro de gHMBC da subfração bioativa 16 da actinobactéria CCMA 33 solubilizada e D_2O .

A estrutura química da substância não foi determinada pelas técnicas de RMN utilizadas neste trabalho, sendo necessário, portanto, experimentos de ^{13}C , o qual pode levar horas para aquisição quando se tem uma massa muito pequena. O dados obtidos nos experimentos de gHMBC apresentados acima não revelou nenhuma correlação com carbonos quaternários, para tanto será essencial a realização do experimento de RMN ^{13}C para elucidação estrutural da substância. Além disso, o gHSQC somente apresenta carbonos ligados a hidrogênio, confirmando portanto a necessidade de RMN ^{13}C para determinação dos carbonos quaternários.

A substância apresentada no espectro de RMN não corresponde as estruturas da Julichrome, substâncias bioativas encontradas na literatura (item 5.9.1 página 84), pois esta classe de compostos apresentam sinais de hidrogênios na região de aromáticos, o que não se observou no espectro de RMN acima.

Apesar da subfração 16 apresentar atividade biológica e no espectro não apresentar sinais correspondentes a ela, isso poderia ser justificado devido a amostra ter apresentado solubilidade muito baixa somente em água deuterada, e não solubilizada em outros solventes disponíveis no laboratório (CDCl_3 , CD_3OD , CD_3COCD_3 e C_6D_6). Além disso, observou-se formação de precipitado após o preparo da amostra para as análises de RMN. Esse precipitado provavelmente corresponde a substância bioativa da subfração 16, que poderia ser da classe das Julichromes. Apesar dessa estrutura não ter sido elucidada quimicamente pelas técnicas de RMN, não se descarta a possibilidade da substância adquirida pela mesma, ser o composto bioativo, que será confirmada futuramente pela técnica de RMN de ^{13}C além de outras.

5.10 Estudos de quimiotaxonomia

A fim de se obter uma análise quimiotaxonômica e comparativa entre os perfis químicos das linhagens de *Streptomyces griseorubiginosus* (CCAL 39, CCMA 33 e CCMA 30) com outras linhagens *Streptomyces lomondensis* (CCAL 02 e CCMA 44) e *Streptomyces sampsonii* (CCAL 10), os extratos brutos dessas linhagens foram submetidos a uma análise no espectrometro de massas Q-TOF com fonte de ionização nanospray (*nanomate*) em modo positivo, no modo de varredura *full scan* para obtenção dos espectros de massas (Figura 37).

Quando comparado o perfil químico dos espectros de massas relativos aos extratos das linhagens CCMA 30, CCMA 33 e CCAL 39 observou-se a grande diversidade de compostos nos extratos brutos de cada linhagem. Apesar dessa grande diversidade de compostos pôde se verificar significativas semelhanças entre os perfis dos metabólitos produzidos pelas linhagens em toda faixa de massas do espectro, em especial os íons de m/z 183,1; m/z 279,1; m/z 387,1; m/z 404,2; m/z 409,1; m/z 425,1 e m/z 767,4.

A semelhança entre os perfis químicos dos metabólitos das três linhagens CCMA 30, CCMA 33 e CCAL 39 é uma indicação química de que a identificação das actinobactérias pelo 16s rRNA está correta, pois segundo esta metodologia as espécies foram identificadas como *Streptomyces griseorubiginosus*. Dessa forma é esperado que quando fermentados nas

mesmas condições os microrganismos do mesmo gênero devam produzir os mesmos metabólitos.

Em relação aos extratos CCMA 02 e CCMA 44, a comparação de seus espectros de massas apresentaram semelhanças entre os perfis químicos dos metabólitos produzidos em toda faixa de massas do espectro, em especial os íons de m/z 301, m/z 304, m/z 409, m/z 425 e m/z 579, assim sugere-se que a identificação pelo 16s rRNA dessas actinobactérias está correlacionada com a diversidade química dos compostos produzidos, sendo portanto verdadeira a identificação das duas linhagens, como *Streptomyces lomondensis*. O extrato bruto da linhagem CCAL 10 não apresentou atividade microbiana expressiva, e através do espectro de massas, observou-se uma grande diferença entre os perfis químicos de seus metabólitos com os das demais linhagens analisadas (CCMA 02, CCMA 44, CCAL 39, CCMA 33 e CCMA 30).

Pela metodologia de identificação molecular 16s rRNA, a linhagem CCMA 10 foi identificada como *Streptomyces sampsonii* e a CCMA02 e CCMA 44 foi identificada como *Streptomyces lomondensis* e a CCMA 30, CCMA 33 e CCAL 39 identificada como *Streptomyces griseorubiginosus*, sendo que o perfil químico dos metabólitos dos extratos observados pela espectrometria de massas está correlacionado com a identificação molecular.

Segundo Smedsgard e Frisvad (1996) a inserção direta dos extratos brutos das bactérias em um espectrômetro de massas operando com fonte de electrospray possibilita a criação de bancos de dados de massas moleculares dos metabólitos e tem sido usado na classificação quimiotaxonômica de microrganismos.

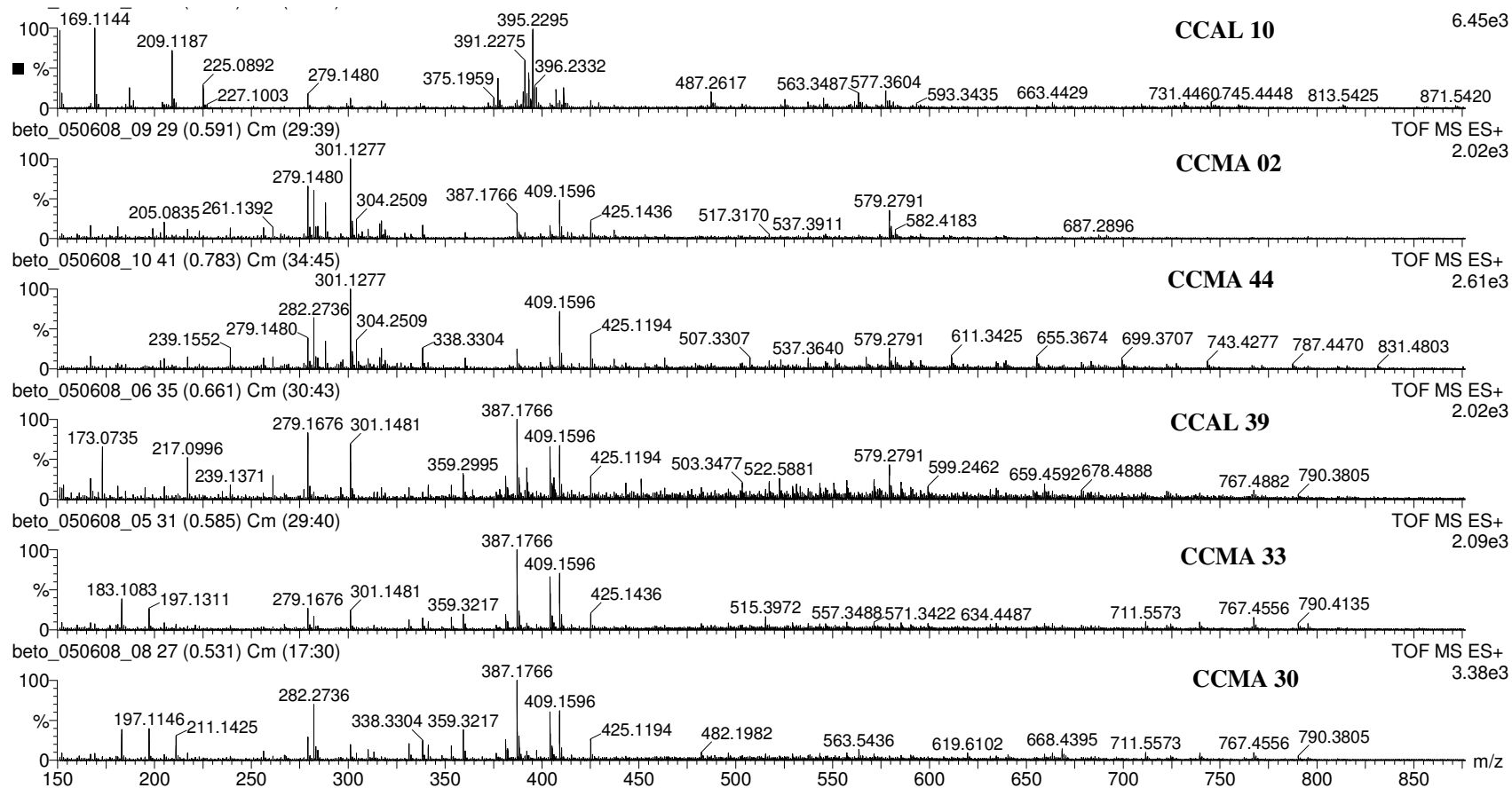


Figura 37. Espectros de nanoeletrospray (*NanoMate*), no modo positivo, dos extratos brutos das actinobactérias CCAL 10, CCMA 02, CCMA 44, CCAL 39, CCMA 33 e CCMA 30, respectivamente.

5.11 Controle biológico de *Pythium aphanidermatum*

O experimento em campo avaliou a eficiência dos metabólitos das linhagens CCMA 30 e CCMA 33, obtidos por fermentação, no controle do tombamento causado por *Pythium aphanidermatum* em pepino. As podridões de raízes e de colos de plantas encontram-se entre os problemas fitossanitários de maior importância mundial. Vários são os fitopatógenos de solo associados às podridões e ao tombamento de plântulas, e algumas espécies do gênero *Pythium* estão entre as mais preocupantes, pois estão amplamente distribuídas e afetam uma grande variedade de culturas de importância econômica (MARTIN e LOPER, 1999).

As cucurbitáceas, principalmente o pepino, são bastante suscetíveis ao ataque de *Pythium* spp. em condições de temperaturas mais elevadas e a espécie *P. aphanidermatum* é encontrada com grande frequência nessas condições (KUCHAREK, 2000).

Para essa análise foi feita à média da incidência da doença (tombamento) em cada tratamento. A análise estatística foi feita pelo teste de Scott-Knott, utilizando o Software SISVAR com nível de 5% de probabilidade (Figura 38).

Para o experimento com pepino, foi utilizada a técnica de estimular a população original de *Pythium* no solo com aveia (Figura 39). A mistura de solo + farelo de aveia tratada com a suspensão da linhagem CCMA 30, acondicionada em bandejas plásticas fechadas por cinco dias, reduziu significativamente o tombamento provocado por *Pythium* spp. em plantas de pepino cultivar Safira, onde obteve-se 86% de plântulas saudias, o dialisado e os metabólitos dessa mesma linhagem apresentaram respectivamente, 52% e 68% de plântulas saudias. Para o solo tratado com o dialisado da linhagem CCMA 33 em bandejas fechadas o tombamento não foi, significativamente controlado apresentando 36% de plântulas saudias. A suspensão da linhagem CCMA 33 e os metabólitos dessa mesma linhagem apresentaram 26% e 38% de plântulas saudias, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram o potencial da suspensão da linhagem CCMA 30 em reduzir a doença (Figura 40). A mistura de solo sem a adição de aveia, acondicionada em bandejas fechadas, não causou tombamento e nem fitotoxidez às plantas

O uso de actinobactérias, seja diretamente como promotoras de crescimento, seja como agentes de controle biológico, é considerado uma excelente alternativa para a redução ou substituição do uso de produtos químicos sintéticos e na produção de alimentos (FREITAS e AGUILAR-VILDOSO, 2004). Actinobactérias isoladas da rizosfera e rizoplano de plantas são bastante estudadas, porque podem promover o crescimento das plantas e controlar fitopatógenos de solo, pois são capazes de crescer e colonizar rapidamente o sistema

radicular, que é o sítio de infecção desses patógenos (PAL e MCSPADDEN GARDENER, 2006).

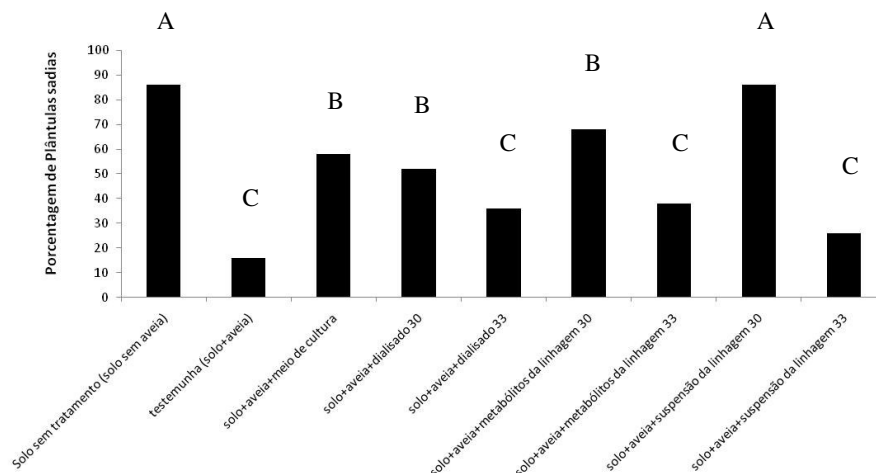


Figura 38. Efeito de duas linhagens de actinobactérias e seus metabólitos no controle de *Pythium aphanidermatum* em plântulas de pepino, cultivar Safira. Mesmas letras não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). Coeficiente de variação de 33,02%.



Figura 39 (A) Plântulas de pepino sem tratamento e sem a presença do *Pythium aphanidermatum*, 100% de plântulas saudias - Testemunha negativa (1º tratamento), (B) Plântulas de pepino sem o tratamento e com a presença do *Pythium aphanidermatum*, 100% de plântulas mortas – testemunha negativa (2º tratamento).



Figura 40. (A) Plântulas de pepino com 86% de plântulas saudias – 8º Tratamento (suspensão da linhagem CCMA 30), (B) Plântulas de pepino com 26% de plântulas saudias – 9º Tratamento (suspensão da linhagem CCMA 33).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que:

- 71% de actinobactérias da rizosfera apresentaram potencial em produzir substâncias antifúngicas, 56% de actinobactérias da rizosfera apresentou potencial em produzir substâncias antimicrobianas contra bactérias Gram positivas e 49% apresentaram atividade contra bactérias Gram negativas.

- Os genes que codificam para as enzimas NRPS e PKS estão presentes em algumas espécies de *Streptomyces*, ou seja, das 20 linhagens de actinobactérias identificadas pelo gene 16S DNAr, 90% dos isolados apresentaram o gene que codifica para o PKS e somente 20% dos isolados apresentaram o gene que codifica para o NRPS.

- A semelhança entre os perfis dos metabólitos analisados pelos seus espectros de massas, no modo de varredura *full scan* dos extratos brutos das linhagens CCMA 30 e CCMA 33 foi uma indicação química de que essas duas linhagens de actinobactérias identificadas pelo 16s rRNA estão corretas, pois segundo esta metodologia as espécies foram identificadas como *Streptomyces griseorubiginosus*. Dessa forma, é esperado que nas mesmas condições elas produzam os mesmos metabólitos.

- O fracionamento do extrato bruto da linhagem CCMA 33 revelou que a fração 7 (m/z 719-768) por MS/MS apresentou atividade antifúngica, onde pelas buscas no dicionário de produtos naturais pode-se confirmar a presença de bisantraquinonas, denominada de Julichrome Q₆₋₆ 10` dihidroxi, substância sintetizada por policetídeos e também a presença de mais duas Julichromes presentes na fração ativa, Julichrome Q₁₋₃ e Julichrome Q₃₋₃.

- Metabólitos de *Streptomyces griseorubiginosus* mostrou potencial de uso na agricultura, inibindo ou reduzindo a podridão causada por *Pythium aphanidermatum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, v. 51, p. 797-814, 2001.

ARAUJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinobactérias. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 352-367.

ARAUJO, J. M. Genética e melhoramento de *Streptomyces*. In: MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. p. 223-244.

BODE, H. B.; MÜLLER, R. The impact of bacterial genomics on natural product research. **Angewandte Chemie**, Berlin, v. 44, p. 6828-6846, 2005.

BROADWAY, R. M.; GONGORA, C.; KAIN, W. C.; SANDERSON, J. P.; MONROY, J. A.; BENNETT, K. C.; WARNER, J. B.; HOFFMANN, M. P. Novel chitinolytic enzymes with biological activity against herbivorous insects. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 24, p. 985-998, 1998.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: UFSCar, 2001. 77 p. (Série Apontamentos da UFSCar).

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 125-132, 1990.

CECILIA, E. G.; COSTA FILHO, G.; MELO I. S. de; SOARES, M. M. S. R. **Controle biológico de *Pythium aphanidermatum* em pepino (*cucumis sativus* L.) por meio de rizobactérias e actinobactérias endofíticas**. Campinas: Faculdade de Ciências Biológicas/Puc-Campinas, 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHALLIS, G. L.; NAISMITH, J. H. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 14, p. 748-756, 2004.

CHATER, K.F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 361, p. 761-798, 2006.

CHATER, K.F.; HORINOUCI, S., Signalling early development events in two highly diverged *Streptomyces* species. **Molecular Microbiology**, New York, v. 48, p. 9-15, 2003.

CHRISTIANSEN, G.; DITTMANN, E.; ORDORIKA, L.V.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M.; BÖRNER, T. Nonribosomal peptide synthase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 176, p. 452-458, 2001.

CHUN, J.; BLACKALL, L. L.; KANG, S. O.; HAH, Y. C.; GOODFELLOW, M. A Proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al. as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, p. 127-131, 1997.

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

CORDELL, G.A.; BEECHER, C.W.W.; KINGHORN, A.D.; PEZZUTO, J.M.; CONSTANT, H.L.; CHAI, H.B.; FANG, L.; SEO, E.K.; LONG, L.; CUI, B.; BARILLAS, K.S. The dereplication of plant-derived natural products. In Atta – ur – Rahman. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.19, p. 749-791, 1997.

COSTA, F. G. **Potencial biotecnológico de actinobactérias endofíticas de milho (*Zea mays* L.)**. 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. **Química Nova**, 29, 287 2006.

DEMAIN, A. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In: DEMAIN, A. **Secondary metabolites: their function and evolution**. Chichester: J. Wiley. 1992. p. 3-23. (Ciba Foundation Symposium, 171).

DEWICK, P.M. The acetate pathway: fatty acids and polyketides. In: DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Chichester: J. Wiley, 1998. p. 32-108.

DONZELLI, B. G. G.; OSTROFF, G.; HARMANA, G. E. Enhanced enzymatic hydrolysis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, p. 1823-1833, 2003.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13-18, 1990.

EL-ABYAD, M.; EL SAYED, M.A.; ELSHANSHOURY, A.R.; EL-BATANOUNY, N.H. Inhibitory effects of UV mutants of *Streptomyces corchorusii* and *Streptomyces spiroverticillatus* on bean and banana wilt pathogens. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, p. 1080-1086, 1993a.

EL-ABYAD, M.; EL-SAYED, M.A.; ELSHANSHOURY, A.R.; EL-SABBAGH, S.M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces spp.* **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 149, p. 185-195, 1993b.

ELLIOT, M.A.; TALBOT, N.J. Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 7, p. 594-601, 2004.

ELVIRA-RECUENCO M.; van VUURDE J.W.L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 1036-1041, 2000.

EMBLEY, T.M.; STACKEBRABDT, E. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 48, p. 257-289, 1994.

ERWIN, T. L. The tropical forest canopy- the heart of biotic diversity. In: WILSON, E.O. (Ed.). **Biodiversity**. Washington, D.C.: National Academy Press, 1988. p. 123-129.

ETCHEGARAY, A. Biossíntese de antibióticos peptídicos em microrganismos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 393-419.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FGUIRA, L.F.B.; FOTSO, S.; MEHDI, R.B.A.; MELLOULI, L.; LAATSCH, H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. Strain US 80. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, p. 341-347, 2005.

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

FUNK, A.; DIVEKAR, P. V. Caerulomycin, a new antibiotic from *Streptomyces caeruleus* Baldacci. I. Production, isolation, assay, and biological properties. **Canadian Journal of Microbiology**. Aug; v. 5, p.317-321, 1959.

GAO, C.X.; LIN, C.Z.; FANG, S.M. Screening of the actinomycetes str. Nongkang 321 and assessment of its inhibitory effect on potato blast. **Fujian Agricultural Science and Technology**, Fuzhou, v. 4, p. 33-35, 1983.

GAVA, C.A.T.; PEREIRA, J.C.; FERNANDES, M. do C.; NEVES, M. C. P. Selection of streptomycetes isolates for the control of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1373-1380, 2002.

GEISSMAN, T.A.; CROUT, D.H.G. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. Boca Raton: Freeman, Cooper & Company, 1969. 592 p.

GIL, V. M. S; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear. Fundamentos, Métodos e Aplicações**, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 549, 1987.

GONZÁLEZ, I.; SACIDO, A. A.; ANDERSON, A.; GENILOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 54, p. 401-415, 2005.

GOODFELLOW, M. Suprageneric classification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Williams & Wilkins, 1989. v. 4.

GOODFELLOW, W.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. Introduction to and importance of actinomycetes. In: GOODFELLOW, W.; WILLIAMS, S.T. **Actinomycetes in biotechnology**. New York: Academic Press, 1998. p. 2-5

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

GUTTE, B. **Peptides**: synthesis, structure, and applications. New York: Academic Press, 2000. 511 p.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, New York, v. 3, p. 307-319, 2005.

HALL, T. **Bioedit, version 5.0.6**. Raleigh: North Carolina State University, Department of Microbiology, 2001. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>. Acesso em: 02 de nov. 2008.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMAN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HANCOCK, R.E.W.; CHAPPLE, D.S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 6, p. 1317-1323, 1999.

HASHIMOTO, K.; NIHIRA, T.; SAKUDA, S.; YAMADA, Y. IM-2, a butyrolactone autoregulator, induces production of several nucleoside antibiotics in *Streptomyces* sp. FRI-5. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 73, p. 449-455, 1992.

HEISEY, R. M.; MISHRA, S. K.; PUTNAM, A. R.; MILLER, J. R.; WHITENACK, C. J.; KELLER, J. E.; HUANG, J. Production of herbicidal and insecticidal metabolites by soil microorganisms. In: HORACE, G. C. (Ed.). **Biologically active natural products**: potential use in agriculture. Washington: American Chemical Society, 1991. p. 65-78. (ACS Symposium Series, 380).

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-32341, 1997.

HIGGS, R.; ZAHN, J. A.; GYGI, J. D.; HILTON, M. D. "Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts". **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 371-376, 2001.

HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**, New York, v. 3, n. 2, p.328- 392, 2002. Reviews 0003.1– 0003.8.

HUTCHINSON, C.R. Microbial polyketide synthases: More and more prolific. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, p. 3336-3338, 1999.

JENKE-KODAMA, H.; SANDMANN, A.; MULLER, R.; DITTMANN, E. Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 22, p. 2027-2039, 2005.

JEZ, J. M.; AUSTIN, M. B.; FERRER, J.; BOWMAN, M. E.; SCHRODER, J.; NOEL, J. P. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. **Chemistry & Biology**, Amsterdam, v. 7, p. 919-930, 2000.

JULIAN, R. K.; JR., R. E. HIGGS, R. E.; GYGI, J. D.; HILTON, M. D. "A Method for quantitatively differentiating crude natural extracts using high-performance liquid chromatography - electrospray mass spectrometry". **Analytical Chemistry**, v. 70, p.3249-3254,1998.

KANG, S. G.; LIM, I. S.; RHO, Y. T.; LEE, K. J. . Production dynamics of extracellular proteases accompanying morphological differentiation of *Streptomyces albidoflavus* SMF301. **Microbiology**, New York, v. 141, p. 3095-3103, 1995.

KANZAKI, H.; KAWABATA, G.; KOBAYASHI, A.; KAWAZU, K. Bisanthraquinones, Inhibitors of Plant Transformation. **Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry**. v. 57, n. 12, p. 2104-2106, 1993.

KEAST, D.; TONKIN, C. Antifungal activity of western australian soil actinomycetes against *Phytophthora* and *Pythium* species and a mycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 36, n. 2, p. 191-203, 1983.

KEATING, T.A.; WALSH, C.T. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 3, p. 598-606, 1999.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 65-76, 1999.

KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 236, p. 335-351, 1996.

KHOSLA, C.; GOKHALE, R.S.; JACOBSEN J.R.; CANE D.E. Tolerance and specificity of polyketide synthases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 68, p. 219-253, 1999.

KO, L.; MAITLAND, A.; FEDAK, P. W.; DUMONT, M. A. S.; BADIWALA, M.; LOVREN, F.; TRIGGLE, C. R.; ANDERSON, T. J.; RAO V.; VERMA, S. Endothelin blockade potentiates endothelial protective effects of ace inhibitors in saphenous veins **Annals of Thoracic Surgery**, Worcester, v. 73, n. 4, p. 1185-1188, 2002.

KUCHAREK, T.; MITCHELL, D. Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium*. In: **Plant pathology fact sheet PP53**. Gainesville: Institute of Food and Agriculture Service, 2000.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 5, p. 150-163, 2004.

LACEY, J. Actinomycetes in soils composts and fodders. In: SYKES, G., SKINNER, F.F. **Actinomycetales: characteristics and practical importance**. London: Academic Press, 1973, p. 339.

LECHEVALIER, H.A. A Practical guide to generic identification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M.E., HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Williams & Wilkins, v. 4. 1989.

LECHEVALIER, H. A.; HORAN, A. C.; LECHEVALIER, H. Lipid composition in the classification of nocardiae and mycobacteria. **Journal of Bacteriology**, New York, v. 105, p. 313-318, 1971.

LOURD, M.; ALVEZ, M. L. B.; BOUHOUT, D. Análise qualitativa e quantitativa de espécies de *Pythium* patogênicas dos solos no Município de Manaus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 479-485, 1986.

LUCKNER, M. **Secondary metabolism in plants and animals**. Trad. T. N. Vasudevan. London: Chapman & Hall. 1972. p. 404.

MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**, Baltimore, v. 97, p. 2651-2673, 1997.

MARTIN, F.N.; LOPER, J.E. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 111-181, 1999.

MARTÍN, J.F.; LIRAS, P.; DEMAÏN, A.L. ATP and adenylate energy charge during phosphate-mediated control of antibiotic synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 822-828, 1978.

MARTIN, T.W.; DAUTER, Z.; DEVEDJIEY, Y.; SHEFFELD, P.; JELEN, F.; HE-HE, M.; SHERMAN, S. H.; OTLEWSKI, J.; DEREWENDA, Z.S.; DEREWENDA, U. Molecular basis of mitomycin C resistance in *Streptomyces*: Structure and function of the MRD protein. **Structure**, Cambridge, v. 10, p. 933-942, 2002.

MARTINS, L. B.; BATISTA, J. H.; LOPES, M. A. Avaliação do potencial de uso do extrato bruto da fermentação por *Streptomyces* sp. T8. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 8, n. 2, p. 36-42, 2006.

MARTINEZ, C. A. F. **Aplicação da espectrometria de massas na derreplicação de extratos brutos produzidos por actinobactérias isoladas da rizosfera do milho (*Zea mays L.*)**. 2009.132 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MELO, I. S. de; SANHUEZA, R. M. V. **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 72 p.

MICROBIAL Identification System Operating Manual. Newark: MIDI, Inc, 2001. 145 p.

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**, Ottawa, v. 35, p. 656-660, 1989.

MIRANDA, M. T. M. **Peptídeos**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 196, p. 207-214, 2001.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Electrospray ionization mass spectrometry applied to study inorganic and organo-metallic species. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MUNTANOLA, C. M.; VUKOJEVIC, J.; MIHALICEVIC, M. Differential growth inhibition of Diaporthe and Phomopsis isolates by the metabolic activity of five actinomycetes. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 289-295, 2000.

NCCLS/CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard- Fifth Edition. [S.l.: s.n.], 2000. (NORMA M7-A5).

PAL, K.K.; McSPADDEN GARDENER, B. **Biological control of plant pathogens**. 2006. <Disponível em: <http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

PIMENTEL, G. F. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. p. 316-333.

PINTO, A. C.; SIQUEIRA SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p.45, 2002.

REDDY, K.V.R.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, London, v. 24, p. 536-547, 2004.

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

ROMEIRO, R. S.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H.; MOURA, A. B.; SILVA, H. S. A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e suas implicações na indução de resistência sistêmica a enfermidades e na promoção de crescimento de plantas. In: CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 32. 1999, Curitiba. **Resumos...** Curitiba, 1999. Suplemento, 255.

RUEGG, U. T., BURGESS, G. M. Staurosporine, K-252, and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. **Trends Pharmacological Sciences**. v. 10. p. 218-220, 1989.

SAADOUN, I.; GHARAIBEH, R. The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potencial as a source of antibiotics active against antibioticresistant bacteria. **Journal of Arid Environments**, London, v. 53, p. 365-371, 2003.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos, 2002. 121 p.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.

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

SHEN, B. **Biosynthesis of aromatic polyketides**. Berlin: Springer - Verlag, 2000. 51 p. (Topics in Current Chemistry, 209).

SIGMUND, J.M.; CLARK, D.J.; RAINEY, F.A.; ANDERSON, A.S. Detection of eubacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases from natural populations of actinomycetes. **Microbial Ecology**, New York, v. 46, p. 106-112, 2003.

SIQUEIRA, J.O. Micorrizas arbusculares In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA M. (Ed.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 151-194.

SINGH M.P.; JANSO J.E.; BRADY S.F. Cytoskyrins and Cytosporones Produced by *Cytospora* sp. CR200: Taxonomy, Fermentation and Biological Activities. **Marine Drugs** v.5, p.71-84, 2007.

SMEDSGARD, J.; FRISVAD, J.C. Using direct mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 25, p. 5-17, 1996.

SOSIO, M.; BOSSI, M.; BIANCHI, A.; DONADIO, S. Multiple peptide synthase gene clusters in actinomycetes. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 264, p. 213-221, 2000.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, New York, v. 44, p. 846-849, 1994.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria class nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, New York, v. 47, p. 479-491, 1997.

SUTHERLAND, E. D.; PAPAVIDAS, G. C. Evaluation of oospore hyperparasites for the control of *Phytophthora* crown rot of pepper. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 131, p. 33-39, 1991.

SWOFFORD, D.; OLSEN, G.; WADDEL, P.; HILLIS, M. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D.M.; MORTIZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.). **Molecular systematics**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Association. p. 407-514, 1996.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific-gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VANMIDDLESWORTH, F., CANNELL, R.J.P. Dereplication and partial identification of natural products. **Methods in Biotechnology**, v. 4 p. 279-327, 1998. (Natural Products Isolation).

VINING, L.C. Secondary metabolism. In: REHM, H.J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: VCH. v. 4, p. 21-29, 1986.

VON DÖHREN, H.; KELLER, U.; VATER, J.; ZOCHER, R. Multifunctional peptide synthetases. **Chemical Reviews**, Washington, v. 97, p. 2675-2705, 1997.

WAKI, M.; NIHIRA, T.; YAMADA, Y. Cloning and characterization of the gene (*farA*) encoding the receptor for an extracellular regulatory factor (IM-2) from *Streptomyces* sp. strain FRI-5. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 179, p. 5131-5137, 1997.

WALSH, C. T. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. **Science**, Washington, v. 303, p. 1805-1810, 2004.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; GENE-TRAK, D.J.L. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WEISSMAN, K. J.; LEADLAY, P. F. Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. **Nature Reviews Microbiology**, Madison, v. 3, p. 925-936, 2005.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E. M. H.; SNEATH, P. H. A.; SACKIN, M. J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, p. 1743-1813, 1983.

WILLIAMS, S.T.; VICKERS, J.C. **Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives.** Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1988. p. 265-270. (Biology of the Actinomycetes, 88).

YUAN, W. M.; CRAWFORD, D. L. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC 108 as a potential biocontrol agent against root and seed rots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3119-3128, 2002.

ZITOUNI, A.; BOUDJELLA, H.; LAMARI, L.; BADJI, B.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAU, N. *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, p. 984-993, 2005.

ZUBERER, D. A.; KENERLEY, C. M.; JEGER, M; J. Population of bacterial actinomycetes associated with sclerotica of *Phymatotrichum omnivorum* buried in Houston black clay. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 112, p. 69-76, 1988.