SARAH PIGATO CANOVA

**DIVERSIDADE E BIOPROSPEÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE
MANGUEZAIS**

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

SÃO PAULO
JANEIRO 2009

DIVERSIDADE E BIOPROSPEÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE MANGUEZAIS

SARAH PIGATO CANOVA

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo

**SÃO PAULO
JANEIRO 2009**

DEDICO

Aos meus pais,
David e Rita,
Pelo amor, carinho, apoio e por dedicarem suas vidas as suas filhas.

OFEREÇO

Às minhas irmãs Natália e Narah,
Pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Itamar Soares de Melo pela orientação e incentivo;

Ao Professor Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, pela disponibilidade em me ajudar nas análises, pela paciência e ensinamentos.

Ao Professor Dr. Wellington Araujo, pelas sugestões e por sempre me receber quando precisei utilizar o laboratório Genética de Microrganismos da Esalq – USP;

Ao Dr. Ricardo Harakava, pela disponibilidade em me ajudar e pelas sugestões dadas durante a realização do meu trabalho;

À Toda Minha Família pelo amor, carinho e incentivo;

Ao Rafael Augusto Santos Luchi pelo amor, amizade e compreensão;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Luciana Frias Reyes, Liliana Patricia Vital de Mattos, Eduardo Penteado Gottardo, Zayame Vegette Pinto, Pietro Agostini, Mariana de Castro Lotto, Marcela Galo, Fabio Lino Soares Junior (Dig), João Paulo Tozzi, Luciana Ap. Avila, Eduardo Roberto de Almeida Bernardo, Tiago Domingues Zucchi, Flávia Mandolesi Pereira de Melo, Alexandre Sereda, Fernando Andreote, Maria Augusta C. F. Machado, Elida Corrêa e Armando Cavalcante Dias, pelo companheirismo, apoio, amizade e agradável convívio;

As alunas da Pós Graduação em Química da USP - Ribeirão Preto, Tânia Petta e Ana Flávia Canovas Martinez, pela amizade e ensinamentos;

Aos Técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Márcia Parma, Rosely Nascimento, João Luiz da Silva pela sempre disposição em me ajudar, pela amizade e excelente profissionalismo;

Ao Ricardo Menghini e João Luiz Silva, pela enorme ajuda nas coletas nos manguezais;

Ao César Roberto Silva de Rosso, técnico do laboratório de Produtos Naturais da Embrapa Meio Ambiente, pela sempre disposição em me ajudar;

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia - USP, pelos ensinamentos e serviços prestados;

A Fapesp pela bolsa concedida;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa e Avaliação de Impacto Ambiental (Embrapa Meio Ambiente), em Jaguariúna-SP, por ceder-me o Laboratório de Microbiologia Ambiental para a realização dos experimentos;

A todos aqueles que, embora não mencionados, sabem que contribuíram em alguma etapa da minha dissertação.

Obrigada por tudo!!!

“As coisas simples são as mais
extraordinárias e só os sábios
conseguem vê-las”.

Paulo Coelho

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura1: Fluxograma referente às metodologias utilizadas	39
Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura dos isolados AMC24 (A), AMC40 (B), R-2-4 (C) e MGE45 (D).....	45
Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem AMC41, <i>Streptomyces rochei</i> , que apresentou morfologia característica do gênero ao qual este isolado pertence.	46
Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem MGE7, <i>Streptomyces thermocarboxydus</i> , que apresentou morfologia característica do gênero ao qual este isolado pertence.	47
Figura 5: Teste de antagonismo. A- Controle positivo, crescimento pleno do patógeno; B- Inibição de <i>P. aphanidermathum</i> pela linhagem AMC1 de <i>Streptomyces fulvorobues</i> isolada do manguezal de Cananéia – SP	49
Figura 6: Análise de DGGE mostrando a estrutura da comunidade rizosférica de actinobactérias em plantas de <i>R. mangle</i> localizadas nos manguezais de Bertioga e Cananéia. M indica os marcadores de corrida, enquanto que os nomes na figura identificam as amostras presentes em cada <i>fingerprinting</i>	51
Figura 7: Formação do halo de inibição micelial de <i>P. aphanidermathum</i> nas concentrações de 3mg/ml e 14mg/ml do extrato bruto de AMC41 e MGE7.....	52
Figura 8: Perfil químico dos extratos orgânicos obtidos pela fermentação das actinobactérias, analisados por espectrometria de massas empregando ionização por electrospray.....	54
Figura 9: Resultado da busca pelos compostos de massa molecular 1148 a 1149 Da.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Novos metabólitos produzidos por actinobactérias marinhos durante o período de 2003-2005.....	20
Tabela 2: Principais diferenças entre Oomycota e fungos verdadeiros	26
Tabela 3: Identificação de actinobactérias de manguezais, análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME) do gene 16S rDNA	42
Tabela 4: Avaliação da atividade antagônica e potencial antibiótico de actinobactérias isoladas de manguezais	48
Tabela 5: Rfs das frações visualizadas sob lâmpada UV com dois comprimentos de onda 254/366 nm	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Manguezais: Descrição e Importância Ecológica	15
3.2 Microrganismos Rizosféricos	17
3.3 Actinobactérias	18
3.4 Metabólitos Secundários Produzidos por Microrganismos	21
3.5 <i>Pythium</i> spp. e <i>Phytophthora</i> spp.: Importância na Agricultura	23
3.6 Microbiologia molecular no estudo de comunidades bacterianas	25
3.6.1 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE - <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)	26
3.7 Métodos cromatográficos para identificações de substâncias	26
3.7.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	27
3.7.2 - Cromatografia por adsorção	28
3.7.3 Ionização por "Electrospray"	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Áreas de Estudos	31
4.2 Coleta de Amostras	31
4.3 Isolamento de Actinobactérias de Manguezais	31
4.4 Identificação dos Isolados pela Análise do Perfil de Ácidos Graxos da Membrana Celular (MIDI-FAME)	32
4.5 Identificação dos Actinobactérias Utilizando o gene 16S rDNA	32
4.6 Caracterização Morfológica de Linhagens de Actinobactérias por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	33
4.7 Análise por meio da técnica de PCR-DGGE	34
4.8 Avaliação do Potencial de Actinobactérias em Inibir <i>Pythium aphanidermathum</i> e <i>Phytophthora</i> sp.	35
4.9 Obtenção de Extratos Orgânicos de Actinobactérias	35
4.10 Atividade Biológica de Extratos Brutos de Actinobactérias	36

4.11	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pelo Método de Difusão em Gelose ou Método dos Discos.....	36
4.12	Análise dos extratos orgânicos das actinobactérias por métodos cromatográficos.....	37
4.12.1	Cromatografia em Camada delgada	37
4.12.2	Cromatografia em coluna	37
4.12.3	Análise dos extratos orgânicos pelo método de Ionização por Electrospray	38
4.13	Bioensaio das frações ativas	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Isolamento de Actinobactérias	40
5.2	Avaliação da Biodiversidade de Actinobactérias de Manguezais.....	40
5.2.1	Identificação de Actinobactérias utilizando o gene 16s rDNA	40
5.2.2	Caracterização Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	43
5.3	Testes de Antagonismo e Antibiose	47
5.4	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	49
5.5	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	51
5.6	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	52
5.7	Cromatografia em coluna	53
5.8	Bioensaio com as frações obtidas dos Extratos Orgânicos.....	53
5.9	Análise por Eletrospray dos Extratos Orgânicos de Actinobactérias.....	53
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

2 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a diversidade de actinobactérias rizosféricas de manguezais e caracterizar os metabólitos secundários produzidos por estes, com atividade biológica contra os fitopatógenos *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora* sp. causadores de podridões radiculares de diversas culturas agrícolas.

2.1 Objetivos específicos:

- Isolar e caracterizar actinobactérias rizosféricas de *Rhizophora mangle* provenientes da Ilha do Cardoso e Bertioga no estado de São Paulo;
- Analisar a comunidade de actinobactérias rizosféricas não cultiváveis por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Eletroforese*);
- Avaliar a atividade antifúngica de actinobactérias, utilizando-se para isso os fitopatógenos de importância agrícola *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora* sp.;
- Analisar o perfil químico dos extratos orgânicos produzidos pelas actinobactérias por espectrômetros de massas;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Manguezais: Descrição e Importância Ecológica

Denomina-se manguezal a comunidade vegetal que se estende ao longo da zona costeira exposta aos processos transicionais do ambiente marinho, estuarino e lagunar, com alternância de inundações derivadas das marés em regime mixohalino (HERZ, 1991), localizando-se ao longo de áreas costeiras de regiões tropicais e subtropicais (KE et al., 2002). São bosques compostos de espécies lenhosas típicas, denominadas mangues, adaptadas a flutuações de salinidade e a sedimento predominantemente lodoso com baixos teores de oxigênio. Ocorrem principalmente em locais abrigados, apresentando condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de inúmeras espécies animais (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

A palavra “mangue” é utilizada geralmente com duas conotações. Uma delas se refere ao grupo de árvores tropicais de famílias relacionadas com características fisiológicas e adaptações especiais, que permitem sua persistência em ambientes modificados como por exemplo variações em salinidade e depleção de oxigênio. A outra é utilizada para se referir ao ecossistema como um todo, embora o mais correto para tal seja manguezal, como *mangrove* do inglês (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000).

Tipicamente, manguezais possuem poucas espécies de mangues, aproximadamente 70 no mundo. Estas, porém, são geneticamente diversas, sendo derivadas de 20 famílias de plantas que desenvolveram adaptações morfológicas e fisiológicas comuns em uma linha evolutiva (DUKE et al., 1998; DUKE e WATKINSON, 2002). Ocupam uma estreita área ecológica, limitada entre o nível médio do mar e marés altas com elevações entre 1 e 2 metros. Apesar destas restrições, os manguezais são bem adaptados ao seu restrito nicho ecológico, embora permaneçam em risco quando as condições ambientais locais mudam drasticamente devido ao rápido desenvolvimento urbano litorâneo, tempestades severas e quando expostas a estresses adicionais, como poluentes (DUKE e WATKINSON, 2002).

A importância ecológica dos manguezais deriva de um grande número de funções desempenhadas por este ecossistema, como amenização do impacto do mar na terra, controle da erosão pelas raízes de mangue (estabilização física da

linha da costa), retenção de sedimentos, nutrientes e mesmo poluentes impedindo o assoreamento e a contaminação das águas costeiras (LAMPARELLI e MOURA, 1999).

Os manguezais também atuam como abrigo da fauna, particularmente em estágios juvenis, e, considerando que esta é a fase mais sujeita a sua predação, o manguezal é considerado um “habitat crítico” na forma de berçário para moluscos, crustáceos e peixes e fonte de alimento para peixes e outros animais (CURY, 2002), oferecendo suporte a mais de 2.000 espécies (HERZ, 1991) e desempenhando, portanto, papel essencial na manutenção da biodiversidade marinha (CURY, 2002).

No mundo inteiro estima-se que existe cerca de 162.000 km² de manguezais (MORAES, 2000), no Brasil, esse ecossistema ocupa uma área de 10.000 a 25.000 km², dependendo da fonte consultada, podendo ser encontrados desde o extremo norte, no Amapá, até o sul de Santa Catarina, na foz do Rio Araranguá (CURY, 2002).

Segundo Herz (1991), os manguezais encontrados na costa do Estado de São Paulo ocupam uma extensão de 231 km². A costa norte do Estado, devido as suas características morfológicas, possui poucas áreas de manguezais isolados que se restringem à desembocadura de alguns rios. Estas áreas compreendem 3,4 km², sendo as mais expressivas localizadas na região de Ubatuba e Caraguatatuba (LAMPARELLI e MOURA, 1999).

A região da Baixada Santista possui uma área total de cobertura vegetal de 1.716,6 km², sendo que aproximadamente 6% desta corresponde a manguezais (CURY, 2002), equivalente a 120,21 km². Os municípios de Santos, seguido por Cubatão, Bertioga, São Vicente e Guarujá possuem as maiores áreas de manguezais da Baixada (LAMPARELLI e MOURA, 1999).

O Litoral Sul do Estado de São Paulo apresenta extensas áreas de manguezais em função da grande extensão da planície costeira nessa região, num total de 107,62 km². Cananéia é o município que apresenta a maior área de manguezal, seguida por Iguape e Ilha Comprida (LAMPARELLI e MOURA, 1999).

No Brasil, a vegetação dos manguezais é representada pelos gêneros *Rhizophora*, *Laguncularia* e *Avicennia*. No gênero *Rhizophora* encontra-se o mangue vermelho, *R. mangle* (Família Rhizophoraceae). O mangue branco é representado pela *Laguncularia racemosa* (Família Combretaceae) e por último, ocorre o mangue

negro representado pelas espécies *Avicennia germinans* e *Avicennia shaueriana* (Família Verbenaceae) (GAMERO, 2001; CURY, 2002).

O mangue vermelho (*R. mangle*) é também conhecido por sapateiro ou mangue verdadeiro. É normalmente encontrado nas franjas dos bosques em contato com o mar ao longo dos canais, na desembocadura de alguns rios ou nas partes dos estuários onde a salinidade não é muito elevada, já que apresenta raízes escora que se encurvam e servem de suporte. As raízes estendem-se a um metro ou mais acima do solo e são cobertas por poros pequenos, as lenticelas, por onde o oxigênio se difunde como filtros que impedem a entrada de sais e favorece a troca de gases com a atmosfera. O embrião germina dentro do fruto, dando origem a uma nova planta, voltada para baixo e que se desprende para se “auto-plantar” (GAMERO, 2001).

Apesar dos manguezais constituírem Área de Preservação Permanente (Lei 4771 de 15 de setembro de 1965 do código florestal), têm sofrido as mais diversas ações antrópicas na sua exploração com finalidades econômicas, agrícolas, pesca predatória, depósito de lixo, dentre outras.

3.2 Microrganismos Rizosféricos

A rizosfera é um termo que foi introduzido por Hiltner em 1904 e que define a camada do solo que é influenciada pelo metabolismo das raízes, o que constitui um nicho amplamente rico em microrganismos devido à exsudação de nutrientes radiculares (BERG et al., 2005).

As rizobactérias são microrganismos benéficos às plantas, que colonizam o sistema radicular, podendo ser simbioses ou saprófitas de vida livre, e vários trabalhos relatam o aumento no crescimento de plantas, induzido por esses microrganismos. Recentemente esses microrganismos têm sido apontados como essenciais ao ecossistema de plantas em relação ao suprimento de elementos de crescimento como nitrogênio, fósforo e possivelmente ferro. Assim, a liberação de exsudados pela raiz cria uma zona rizosférica rica em energia, facilitando aos microrganismos presentes a mineralização desses nutrientes dos restos de matéria orgânica, tornando-os disponíveis para imediata absorção das raízes (MELO, 1998).

Dentre os mecanismos de ação de rizobactérias, a produção de compostos antibióticos tem sido considerada, como um dos mais importantes mecanismos, pois atua na supressão de patógenos da rizosfera.

A colonização de raízes é um pré-requisito para a manutenção e sobrevivência de bactérias, bem como para o eficiente controle de patógenos de solo. Um importante passo na obtenção de rizobactérias que apresentam atividade antibiótica é a realização de um eficiente esquema de seleção. Naturalmente, essas bactérias devem apresentar uma capacidade seletiva eficiente quanto à sobrevivência na rizosfera. Desse modo, estes microrganismos competem por nutrientes e elementos essenciais no solo e na rizosfera, fazendo com que a competição entre uma rizobactéria e um patógeno possa resultar na substituição ou exclusão deste último (WELLER, 1988). Como inibem o crescimento ou a sobrevivência dos patógenos através da produção de antibióticos ou outros metabólitos, podem proporcionar uma melhor e mais consistente proteção das raízes e consequentemente maior crescimento de plantas (MELO, 1998).

3.3 Actinobactérias

Actinobacteria é um filo de bactérias Gram-positiva, com alto teor de G + C, organização filamentosa e muitas vezes ramificada. Dada sua semelhança com fungos e por produzirem, como estes, cadeias de esporos semelhantes a conídios, as Actinobactérias são com frequência erroneamente classificadas como tais. Ao contrário dos fungos, porém, são organismos procarióticos, em sua grande maioria aeróbios.

Neste grupo estão incluídos gêneros com diferentes características morfológicas, como: *Micrococcus*, *Arthobacter* e *Corynebacterium*, que podem se reproduzir por fissão binária; *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, denominados actinobactérias nocardiformes e que apresentam micélio substratal rudimentar seguido de fragmentação em elementos cocóides ou semelhantes a bastonetes que dão origem a um novo micélio. No outro extremo, está o grupo “esporoactinobactérias” com grande complexidade morfológica, com a formação de esporos em regiões específicas do micélio, como *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, que exibem uma rede de micélio aéreo bem desenvolvido, diferenciada em estruturas especializadas como artrósporos em cadeia

(*Streptomyces*), esporos em vesículas (*Actinoplanes* e *Streptosporangium*) e endósporos (*Thermoactinomyces*) (CHAPTER e HOPWOOD, 1993; CROSS, 1989; LECHEVALIER e LECHEVALIER, 1981).

As actinobactérias apresentam a célula com organização procariótica típica, com uma região nuclear fibrilar e um citoplasma granular com ribossomos. Este citoplasma é envolvido por uma membrana unitária típica que pode conter uma variedade de outras inclusões, dependendo da espécie, idade do meio de crescimento. A morfologia da colônia pode variar desde uma organização micelial complexa, semelhante àquela observada para alguns eucariotos, até estruturas fragmentadas semelhantes a bastonetes ou cocos.

Actinobactérias são naturalmente habitantes do solo, que se adaptam às diversas condições do ambiente (GOODFELOW e WILLIAMS, 1983), produzem antibióticos (KORN-WENDISCH e KUTZNER, 1992) e são capazes de colonizar a rizosfera de plantas (MILLER et al., 1989) e tecidos internos das plantas de interesse (SARDI et al., 1992., de ARAÚJO et al., 2000).

De modo geral, há grande interesse da indústria no isolamento e caracterização destes organismos, uma vez que vários grupos são produtores de antibióticos, metabólitos farmacologicamente ativos (antinflamatórios, imunomoduladores) e enzimas extracelulares de aplicação industrial (e.g., celulase, esterases) e úteis na biodegradação de diversos compostos recalcitrantes, incluindo agrotóxicos e demais poluentes ambientais (LEIVA et al., 2006).

Na área agrícola, alguns metabólitos secundários produzidos por actinobactérias têm sido comercializados como fungicidas. Neste grupo estão incluídos gêneros com diferentes características morfológicas, dentre os membros da família *Actinomycetales*. Espécies de *Streptomyces* são produtoras de antibióticos, enzimas e inibidores enzimáticos, com aplicações nas áreas de medicina, agricultura e veterinária.

Desde a segunda metade do século XX, cerca de 50.000 produtos naturais provenientes de microrganismos foram descritos, dos quais 10.000 são biologicamente ativos e mais de 8.000 são agentes antibióticos e antitumorais. Os principais produtores destes metabólitos são bactérias de solo da ordem *Actinomycetales*, cujo cultivo dos isolados são importantes fontes de agentes terapêuticos, como estreptomicina, aminoglicosídeo, macrolídeos e tetraciclina (LEIVA et al., 2006).

LAM, (2006) apresentou alguns exemplos de metabólitos secundários isolados de actinobactérias marinhos entre os anos de 2003 e 2005 (Tabela 1). Sendo notável a produção no período de três anos de muitos produtos com diversas estruturas de atividade biológica.

Três compostos desta tabela são interessantes: (a) Absomicina C, antibiótico produzido pela linhagem *Verrucosipora* sp. Isolada de ambiente marinho que inibe a síntese do ácido fólico e apresenta uma grande atividade contra bactérias Gram positiva; (b) Diazepinomicina (ECO-4601), produzida por linhagens de *Micromonospora* sp. Possui atividade antibacteriana, anti-inflamatório e antitumoral. Apresenta largo espectro de citotoxicidade in vitro e tem demonstrado em cobaias atividades contra glioma, câncer de mama e próstata; (c) Salinosparamida A (NPI – 0052), isolado da fermentação da actinobactéria marinha *Salinispora tropica*, inibidor da protease oral, induzido apoptose de mieloma. NPI-0052 está no começo da fase clínica para tratamento de câncer em humanos, pela Nereus Pharmaceuticals (LAM, 2006). De acordo com Prudhomme et al. (2008), este composto também tem sido usado contra parasita de malária humana.

Tabela 1: Novos metabólitos produzidos por actinobactérias marinhos durante o período de 2003-2005.

Composto	Microrganismo	Atividade
Abyssomicina	<i>Verrucosipora</i> sp.	Antibacteriano
Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Anticancerígeno
Bonactin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriano; antifúngico
Caprolactones	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancerígeno
Chandrananimycins	<i>Actinomadura</i> sp.	Antibacteriano; anticancerígeno; antifúngico
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancerígeno
Chloro-dihydroquinones	<i>Novel actinomycete</i>	Antibacteriano; anticancerígeno
Diazepinomicin (ECO-4601)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacteriano; anticancerígeno; anti-inflamatório
3,6-disubstituted indoles	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancerígeno
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacteriano
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriano
Himalomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriano
IB-00208	<i>Actinomadura</i> sp.	Anticancerígeno
Komodoquinone A	<i>Streptomyces</i> sp.	Neuritogenic activity
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacteriano
Gutingimycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriano
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacteriano

Tabela 1: Novos metabólitos produzidos por actinobactérias marinhas durante o período de 2003-2005 (continuação).

Composto	Microrganismo	Atividade
Marinomycina	' <i>Marinispota</i> '	Antibacteriano; anticancerígeno
Mechercharmynina	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancerígeno
MKN-349A	<i>Nocardiopsis</i> sp.	Desconhecido a atividade biológica
Salinosporamide A (NPI-0052)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancerígeno
Sporolides	<i>Salinispora tropica</i>	Desconhecido a atividade biológica
Trioxacarcina	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriano; anticancerígeno; antimalária

3.4 Metabólitos Secundários Produzidos por Microrganismos

Metabólitos secundários são compostos especiais com estruturas geralmente diferentes das de metabólitos primários como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, dos quais podem ser derivados. Entre estes compostos encontram-se antibióticos, pigmentos, toxinas indutoras de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de resposta imunológica, agentes antitumorais, feromônios, promotores de crescimento de animais e plantas (DEMAIN, 1992).

O metabólito secundário não é essencial para o crescimento dos microrganismos que os produzem, mas é uma via alternativa que colabora para a sua sobrevivência na natureza. Metabólitos originários desta via possuem estruturas químicas pouco comuns, como novos açúcares e nucleosídeos, policetídeos cíclicos compostos por aminoácidos não naturais. A produção de metabólitos secundários por microrganismos encontra ampla aplicação na área de fármacos e de agroquímicos (ROBINSON, 1988).

Os antibióticos são metabólitos secundários produzidos por microrganismos e excretados para o meio de cultura no fim da fase de crescimento exponencial (quando se inicia a fase estacionária) (MELO, 2005). Esses metabólitos freqüentemente produzidos por antagonistas de baixo peso molecular (<1 KDa) quando os nutrientes se tornam limitados, podem inibir o crescimento microbiano (LEWIS, 1995).

Muitas bactérias podem produzir antibióticos, não sendo todos os que são importantes no controle biológico, contudo, há um grande número de bactérias produtoras de antibióticos usados no controle biológico e esses antibióticos são usados no controle de diferentes fungos patogênicos (ROSALES et al., 1995).

O desenvolvimento de pesticidas apresenta vários problemas, sendo um dos mais sérios a associação de resíduos químicos envolvidos com o ecossistema e o surgimento de um fungo ou inseto resistente ao pesticida. Surgindo então o interesse em estudos relacionados a metabólitos microbianos. As principais vantagens dos metabólitos microbianos contra os pesticidas são: (a) apresentam atividade e estrutura mais versátil; (b) são biodegradáveis. Geralmente são degradados em um mês, ou em alguns dias, quando expostos no solo, espera-se com isso que o estresse e a poluição dos ecossistemas diminuam (TANAKA e OMURA, 1993).

Muitos dos antibióticos antifúngicos produzidos *in vitro* são identificados como antibióticos de peptídeos (KATZ e DEMAINE, 1977). As atividades dos antibióticos dependem do pH e da concentração de nutrientes no ensaio (LEIFERT et al., 1995). Novas classes de peptídeos com propriedades químicas variadas estão sendo isolados de diferentes vertebrados, invertebrados, como também de bactérias e que apesar da espantosa diversidade na estrutura e na natureza química exposta por estas moléculas, todas elas apresentam atividade antimicrobiana. Sendo assim, são considerados como “antibióticos naturais” e como uma nova alternativa para antibióticos químicos, como uma das promessas da biotecnologia (MARSHALL e ARENAS, 2003).

O conhecimento adquirido nas últimas duas décadas e a descoberta de um novo grupo de peptídeos antimicrobianos a partir de fontes naturais é o elemento básico da nova geração das drogas para o tratamento de infecções causadas por bactérias e fungos (de LUCCA, 2000; HANCOCK, 2000).

Algumas linhagens de microrganismos ou células possuem a habilidade de sobreviver na presença de um determinado antibiótico. Essa resistência pode ser intrínseca (ou natural), determinada pelo gênero da bactéria e pelo espectro de ação do antimicrobiano; ou selecionada, a qual pode ser manifestada por algumas cepas de uma mesma espécie bacteriana e é resultante de uma mutação ou inativação de um gene ou da aquisição de material genético novo (BARTH, et. al., 2001).

A resistência pode ser transmitida de maneira vertical para toda a progênie da bactéria mutada, ou ainda ser transmitida de forma horizontal para outras bactérias, inclusive de gênero diferente. A transmissão horizontal pode ser feita através de elementos genéticos móveis, como plasmídios, bacteriófagos, transposons e ainda por transformação (LEVY e MARSHALL, 2004).

O aparecimento de organismos resistentes ocorre somente quando este entra em contato com antibióticos, porque o medicamento inibe o crescimento das cepas suscetíveis, mas seleciona as resistentes. No entanto, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos na agricultura e pecuária, predispõe o aparecimento de resistência no ambiente (LEVY e MARSHALL, 2004).

3.5 *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp.: Importância na Agricultura

O gênero *Pythium* possui representantes terrestres e aquáticos, parasitas ou saprófitas, sendo a maioria deles cosmopolitas. Segundo Kirk et al. (2001), o gênero está compreendido por 127 espécies, das quais muitas são responsáveis por sérios problemas em plantas de interesse econômico, causando apodrecimento de frutas, raízes, troncos e tombamento de pré e pós-emergência ("damping-off"). Encontra-se entre os mais freqüentes patógenos veiculados pelo solo, especialmente em cultivos intensivos. A facilidade de disseminação via água de irrigação, substratos, muda e implementos agrícolas contaminados agravam o problema (JARVIS, 1992).

A principal característica morfológica para identificação do gênero *Pythium* é a reprodução assexuada por meio de zoósporos biflagelados, onde a maturação e desenvolvimento dos zoósporos não ocorrem dentro do zoosporângio, e sim, no interior de uma vesícula evanescente formada no ápice do tubo de descarga do zoosporângio. A reprodução sexuada é caracterizada pela formação de oogônio (gametângio feminino) e anterídio (gametângio masculino). O esporo originado da reprodução sexual é chamado de oósporo (gameta feminino fecundado) (ALEXOPOULOS et al. 1996).

Diversos autores mostraram, ao longo das últimas décadas, uma inconstante e variável classificação do filo Oomycota, ao qual pertence o gênero *Pythium*, com a inserção do filo em diferentes reinos. Sendo assim, espécies de *Pythium* foram reclassificadas como pertencentes ao Reino Chromista. Algumas características, que compreendem a classificação destes microrganismos neste Reino, são a

produção de esporos assexuais com flagelos heterocontos (tipo tinsel e chicote), denominados zoósporos, produção de esporos sexuais de parede espessa chamados oósporos, constituição da parede celular de celulose, fase vegetativa diplóide e crista mitocondrial tubular (CORLISS, 1994; VAN WEST et al., 2003).

O gênero *Phytophthora* também pertence ao Reino Chromista e como o *Pythium* era até recentemente considerado fungo verdadeiro e pertencente ao reino Fungi, porém estes diferem dos fungos verdadeiros em relação a várias características estruturais, bioquímicas, fisiológicas e moleculares (VAN WEST et al., 2003). De forma bastante simplificada, a Tabela 2 enumera algumas dessas diferenças.

Zadoks et al. (1979) relataram que os patógenos respondem a estímulos ou sinais do ambiente como qualquer outro ser vivo. Os principais estímulos da natureza são a água e a temperatura. Na presença da água no estado líquido, os esporos iniciam de forma obrigatória e irreversível o processo de infecção. Esse processo compreende as subfases de germinação do esporo, crescimento do tubo germinativo, penetração e estabelecimento do parasitismo. Após a duração do molhamento foliar contínuo por tempo suficiente para o estabelecimento do parasitismo, a superfície da planta até poderá secar e o parasita não mais perderá sua viabilidade por estar abrigado abaixo da epiderme foliar e nutrindo-se do hospedeiro, sendo a temperatura o elemento que governará a velocidade do crescimento do micélio. Caso a duração do molhamento foliar não permitir o estabelecimento do parasitismo, e a superfície do órgão suscetível secar, o esporo perderá a viabilidade por dessecação, por ser uma estrutura sensível à desidratação.

Algumas espécies de *Phytophthora* de solo podem causar tombamento ou “damping off” assim como espécies de *Pythium*. O tombamento ocorre quando o fungo infecta tecidos da base do caulículo de plântulas semi-germinadas, onde aparecem lesões de coloração escura. Quando a umidade e temperatura são elevadas, há rápido crescimento das lesões provocando morte das plântulas (FEICHTENBERGER et al., 1997).

A dispersão do patógeno ocorre pelo vento, água e insetos. O ciclo completo desse patógeno pode ocorrer em menos de cinco dias em cultivares suscetíveis e os esporos também infectam os tubérculos, os quais apodrecem durante o armazenamento ou são fonte de inóculo primário se no plantio seguinte forem utilizados como tubérculos-semente. (FRY et al., 1997)

Tabela 2: Principais diferenças entre Oomycota e fungos verdadeiros

Oomycota (Reino Chromista) <i>(Pythium, Phytophthora, Peronospora, Pseudoperonospora, Plasmopara, Bremia, Albugo, Sclerospora, etc.)</i>	Fungos verdadeiros (Reino Fungi) <i>(Todos os fungos verdadeiros - Ascomycetos, Basidiomycetos, Zigomycetos)</i>
Fase somática ou vegetativa diplóide	Fase somática ou vegetativa, haplóide ou dicariótica.
Paredes celulares compostas por β 1-3 e β 1-6 glucanas e celulose.	Paredes celulares constituídas basicamente por quitina.
Mitocôndrias achatadas.	Mitocôndrias apresentando cristais tubulares.
Sistema de retículos tubulares móveis conectados com pequenos vacúolos.	Sistema vacuolar tubular fino móvel conectado com grandes vacúolos.
Zoosporos presentes em vários membros do grupo apresentando dois flagelos, um anterior, o tinsel, tátil e sensitivo e outro posterior, o chicote, para mobilidade. Semelhantes aos de certas algas clorofiladas como as Xanthophytas.	Ausência de zoósporos. Alguns membros apresentando aplanósporos (Zigomycota).
Sintetizam lisina por vias diferentes dos fungos verdadeiros.	Sintetizam lisina por vias diferentes dos Oomycota.
Falta de síntese dos esteróis ou sintetizam apenas o fucosterol.	O esteroide sintetizado é o ergosterol.
Linha evolutiva distinta dos fungos verdadeiros conforme codificação do RNA ribossômico.	Linha evolutiva distinta dos Oomycota conforme codificação do RNA ribossômico.

3.6 Microbiologia Molecular no Estudo de Comunidades Bacterianas

A maioria das técnicas moleculares aplicadas a estudos microbiológicos baseia-se nas diferenças de composição dos genes ribossomais. Em bactérias, o gene 16S ribossomal (16S DNAr) é o mais amplamente utilizado, sendo considerado uma das mais importantes moléculas para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (LOUWS, et al., 1999). O seqüenciamento desse gene permite a identificação de microrganismos no nível de gênero e possivelmente no nível de espécie, como também pode permitir correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEY et al., 2000).

3.6.1 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

O PCR-DGGE é um método de estudo utilizado em levantamentos e comparações na composição e diversidade de comunidades microbianas (RANJARD et al., 2000). A técnica de DGGE separa *amplicons* de PCR de tamanhos similares com base na diferença de composição de sequências em um gel com gradiente de desnaturação. A técnica apresenta alta resolução na qual um grande número de amostras pode ser rapidamente comparado revelando a dinâmica de comunidades microbianas (MUYZER et. al., 1993).

No início do desenvolvimento da técnica as comparações entre comunidades bacterianas eram feitas utilizando iniciadores ou *primers* para o domínio Bacteria, os chamados *primers* universais (MUYZER et. al., 1993; HEUER et al., 1997). Posteriormente, alguns *primers* grupo-específico foram descritos, tendo como principais vantagens a acessibilidade de determinadas populações bacterianas separadamente e também uma melhor definição de perfis nas análises de comunidades bacterianas complexas, como as presentes no solo e na rizosfera. Alguns *primers* selecionam grandes grupos bacterianos, como as classes α , β -proteobactéria (GOMES et al., 2001) ou actinobactérias (HEUER et al., 1997). De maneira mais específica, *primers* foram desenvolvidos para acessar populações mais restritas, como por exemplo gêneros, dentre os quais podem ser citados os *primers* específicos para os gêneros *Pseudomonas*, *Paenibacillus* (DA SILVA et al., 2003) e *Burkholderia* (SALLES et. al., 2002). Todos estes *primers*, tanto universais como os grupo específicos, foram desenvolvidos tendo como base o gene 16S ribossomal.

3.7 Métodos Cromatográficos para Identificação de Substâncias Orgânicas

De modo geral, as técnicas cromatográficas são de larga aplicação em química e bioquímica, na pesquisa e na indústria. Segundo Collins, Braga e Bonato (1990) estas técnicas cromatográficas variam desde as de extrema simplicidade, que podem ser facilmente manipuladas por não-peritos, até as de alta sofisticação,

usadas só por especialistas. Entre estes dois extremos existem muitas variações de maior ou menor complexidade.

Os termos “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” são atribuídos ao botânico Mikhael Semenovich Tswett, que em 1906, utilizou estes termos em dois trabalhos descrevendo suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas e gema de ovo, onde usou colunas de vidro recheadas com vários sólidos, finalmente divididos, e arrastou os componentes com éter de petróleo. O nome deriva-se das palavras gregas “chrom” (cor) e “graphe” (escrever), embora o processo não dependa da cor, exceto para facilitar a visualização dos componentes separados.

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas por si mesmas ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (COLLINS et. al., 1990).

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS et. al., 1990).

Entretanto, considera-se que a classificação mais importante em cromatografia baseia-se no mecanismo de separação, que pode ser por processos físicos, químicos ou mecânicos (COLLINS et. al., 1990).

3.7.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Esta técnica teve início com os trabalhos de Izmailov e Shraiber em 1938, sendo que somente a partir da

década de 60 passou a ser largamente utilizada, de tal forma que hoje é praticamente indispensável em qualquer laboratório que envolva análise de substâncias orgânicas e organometálicas (COLLINS et. al., 1990).

O grande desenvolvimento desta técnica é consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, tais como: fácil compreensão e execução, separações em breve espaço tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Pode ser de aplicação analítica ou preparativa, cuja escala está na dependência da espessura da camada de adsorvente e da amostra em análise (COLLINS et. al., 1990).

O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. Entretanto, usando fases estacionárias tratadas pode ocorrer também por partição ou troca iônica, o que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas. A CCD é a mais simples e a mais econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende separação rápida e identificação visual. Ela tem demonstrado ser de valor extraordinário na análise de substâncias orgânicas e inorgânicas, acompanhamento de reações em sínteses e de processos de purificações. Seria muito difícil relacionar todas as aplicações da CCD; mais fácil seria citar que ela está presente em quase todos os laboratórios de química ou biologia, em face de fatos como a existência de diferentes fases móveis e estacionárias, diferentes técnicas de desenvolvimento e visualização, a sua rápida execução, a sua reprodutibilidade e ao seu custo não elevado (COLLINS et al., 1990).

3.7.2 Cromatografia por Adsorção

Empiricamente considera-se a cromatografia na qual se usa uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida, onde a sorção isotérmica (adsorção) refere-se a um aumento da concentração do material (que está em excesso na fase móvel) entre as superfícies das fases móvel e estacionária. Esta cromatografia em coluna (adsorção) pode ser primeiramente escolhida porque é tecnicamente mais simples não exigindo instrumentação esmerada. Dependendo do tamanho da coluna usada, é facilmente aplicada para fins preparativos, devendo ser monitorada, principalmente, por cromatografia em camada delgada. A fase móvel, quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo os

componentes da amostra que está sendo cromatografada. A velocidade de movimento descendente de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, isto é, quanto mais fracamente o componente for adsorvido mais rápido é sua passagem pela coluna, e vice versa. Conclui-se, portanto, que quanto maior a diferença entre os coeficientes de adsorção, mais completa será a separação do composto (terá maior grau de pureza). Esta separação dos componentes de uma mistura é devido às diferenças nas forças de adsorção (forças eletrostáticas de van der Waals) entre eles e o adsorvente (COLLINS et. al., 1990).

3.7.3 Ionização por "Electrospray"

Embora seja normalmente considerada como uma fonte de ionização, o "electrospray" é, na realidade, um processo de transferência de íons pré-existent em solução para a fase gasosa. Pode-se dizer que a efetiva ionização (transformação de uma espécie neutra em um íon) é um efeito secundário. De qualquer forma, é fácil entender porque uma técnica que permite a transferência de íons de uma solução para a fase gasosa para análise por espectrometria de massas, em tão pouco tempo, teve um impulso tão grande: isto se deve ao fato da maioria dos processos químicos e bioquímicos ocorrerem em fase líquida, envolvendo muitas vezes espécies pouco voláteis (Moraes & Lago, 2003).

O "electrospray" foi sugerido como um possível modo de ionização para espectrometria de massas por Dole em 1968. No entanto, seus experimentos não foram convincentes, pois estes visavam à análise de espécies poliméricas, como poliestireno, que não estão ionizados em solução. A ionização por "electrospray" envolve a formação de um "spray" eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. A implementação de uma fonte de "electrospray" é relativamente simples, comparando-se com outras fontes para espectrometria de massas. As principais aplicações da ionização por "electrospray" têm sido os estudos na área de bioquímica e química orgânica. No entanto, vem crescendo o interesse na técnica para aplicação em estudos fundamentais, de organometálicos e complexos inorgânicos. No Brasil, os estudos para aplicações bioquímicas e orgânicas têm avançado bastante nos últimos três anos, mas tem sido muito modesta a aplicação da técnica para estudos eletroquímicos e de complexos inorgânicos, entre outros. A técnica de ionização por

"electrospray" apresenta uma enorme versatilidade e é uma importante ferramenta nos mais variados estudos desde a identificação e quantificação de espécies inorgânicas e organometálicas até medidas isotópicas e especiação. Uma das grandes vantagens da técnica é a relativa simplicidade da fonte de ionização comparada a outras fontes utilizadas na espectrometria de massas, o que permite uma grande versatilidade de configurações, dependendo da criatividade do pesquisador (MORAES e LAGO 2003).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Áreas de Estudo

As plantas de *R. mangle* foram coletados em dois manguezais localizados no estado de São Paulo. O primeiro deles está localizado em um ambiente conservado, o Parque Estadual da Ilha do Cardoso, que fica no município de Cananéia, enquanto que o segundo manguezal amostrado apresenta contaminação por petróleo e se localiza no município de Bertioga. A área amostrada em Cananéia, consiste em uma transversal com 340m de extensão ao longo do gradiente de inundação no manguezal do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC) de orientação 180°S com início na bacia de Trampandé, estendendo-se até o ambiente terrestre. As coordenadas geográficas para a área são: Latitude (S) 22°42'01,00" e Longitude (W) 46°58'57,7". As características físico-químicas determinadas para a área (Sonda Horiba, modelo U-10) foram: pH, 7,7; oxigenação, 4.4 e temperatura: 28 °C.

Para Bertioga, a área foi georreferenciada (franja do bosque) em Latitude (S) 23°53'79,5" e Longitude (W) 46°12'45,6" e compreende ambiente que foi impactado em Outubro de 1993 por derramamento de petróleo em uma área de 3500m³, à partir de um oleoduto da Petrobrás na altura do quilômetro 93 da rodovia Rio-Santos. As características físico-químicas determinadas para a área (Sonda Horiba, modelo U-10) foram: pH, 5.9; oxigenação, 0.6 e temperatura: 21 °C.

4.2 Coletas de Amostras

A partir de três pontos diferentes (ponto A: franja, ponto B: zona intermediária e ponto C: restinga), foram coletadas três plantas de *R. mangle*.

Sendo mantida a baixa temperatura e transportadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente onde foram feitos os isolamentos de actinobactérias.

4.3 Isolamento de Actinobactérias de Manguezais

Para o isolamento de actinobactérias da rizosfera, sedimentos aderidos as raízes foram coletados da superfície destas, até perfazer 1g de sedimento por planta, que foi suspenso em 9 mL (1:10) de água destilada esterilizada e

homogenizado a 10.000 g., por 2 minutos. As amostras foram submetidas a uma diluição em série em solução salina (10^{-1} a 10^{-5}). De cada uma as diluições foram retirados 100 μ L e semeados em placas contendo o meio de cultivo Amido Caseína Ágar (ACA) (item 1.3 do anexo), seletivo para actinobactérias. As culturas foram incubadas por até 30 dias a 28°C. Durante esse período, colônias típicas de actinobactérias foram purificadas por meio de inoculação em estrias cruzadas em meio ACA.

4.4 Identificação de Actinobactérias pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME).

Os isolados foram submetidos à análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (MIDI-FAME) de acordo com o manual do equipamento da Agilent (cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector *Flame Ionization Detector* (FID)), modelo 7683 e programas *ChemStation* A0901[1206] e *Sherlock* 4.0. O método e a biblioteca selecionados foram ACTINI 3.80.

4.5 Identificação de Actinobactérias Utilizando o Gene 16S DNAr

Os isolados foram cultivados em 10 mL de meio de cultura AC (item 1.2 do anexo) e incubados por 4 dias a 28 °C, em shaker, à 10.000 g. Após esse período, a suspensão bacteriana foi recolhida em tubos de 15 mL e centrifugada por 10 minutos a 7.000 g; o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 500 μ L de TE (Tris-HCl 1 Mol/L pH 7,5, 10 mL; EDTA 0,5 Mol/L pH 8,0, 2 mL; água destilada, 1000 mL) e centrifugado 13.000 g;. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspensionado em 500 μ L de TE, onde foram adicionados 30 μ L de SDS 10% e 0,5 g de sílica. O material foi mantido por 10 minutos em banho-maria a 80°C e agitados por 2 minutos, cada amostra, em vortex, para lise da parede celular. O DNA foi extraído com fenol/clorofórmio 1:1 e precipitado com isopropanol e NaCl (5 Mol/L). A lavagem do DNA foi realizada com etanol 70%, seco a 37 °C. Após a ressuspensão do material em 50 μ L de água Milli-Q, este foi estocado a -20 °C.

Para amplificar o DNA das actinobactérias, reações de PCR foram realizadas

em um volume final de 50 μ L, contendo 5 μ L (10 ng) de DNA molde; 0,2 μ M do primer 027F (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC -3') e do primer R1387 (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'); 200 μ M de cada dNTP (Invitrogen®); 3,75 mMol/L de MgCl₂; 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Em todos os experimentos foi adicionada uma reação sem DNA como controle negativo. Foi utilizado termociclador (Gene AMP PCR System 9700) programado para gerar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94 °C, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 63 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Foram utilizados 5 μ L da reação para a observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 450 pb. O produto do PCR foi purificado com kit (Pure Link PCR Purification Kit®) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciado com o primer 027F.

Para identificação, o gene 16S do RNA foi seqüenciado em termociclador (Gene AMP PCRSystem 9700) e, posteriormente, as seqüências analisadas por meio do BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), contra a base de dados (GenBank), onde foi observada a similaridade destas seqüências com o 16S DNAr de espécies já depositadas nesta base de dados.

4.6 Caracterização Morfológica de Linhagens de Actinobactérias por Meio de Microscopia Eletrônica de Varredura

Observações ultraestruturais e avaliações morfológicas dos isolados AMC41, MGE7, AMC24, AMC40, MGE45 e R-2-7, foram feitas por meio de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução.

Os isolados foram crescidos em meio ACA durante cinco dias à 30 °C. Depois de observada a completa esporulação das actinobactérias, foi feito esfregaço em lamínula com aproximadamente 10 mg (uma alçada cheia) de cada colônia e em seguida deixados à temperatura ambiente em dessecador durante sete dias para completa secagem das amostras. Para o manuseio da amostra no metalizador e microscópio eletrônico de varredura, foi necessário preparar a lamínula, colando-a num suporte, denominado “stub”. Utilizando o metalizador Emitech, os “stubs” foram metalizados com ouro em um ciclo de três minutos com 25 mA e observados em

microscópio eletrônico “field emission” de varredura Gemini Leo 982 Leica Zeiss do laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente.

4.7 Análise Estrutura da Comunidade de Actinobactérias por Meio da Técnica de PCR-DGGE

Na técnica de PCR-DGGE o DNA extraído diretamente da amostra ambiental foi utilizado para amplificação e posterior separação dos *amplicons* em gel com gradiente desnaturante. Desta maneira, o DNA presente em 0,5 g de solo rizosférico foi extraído utilizando o *MoBio UltraClean™ soil DNA kit* (MoBio Laboratories, EUA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram verificadas em gel de agarose a 1,2%.

A amplificação do fragmento do gene 16S DNA de actinobactérias foi realizada diretamente com os *primers* 243F e R1387 (HEUER, H. e SMALLA, K., 1997), resultando em um *amplicon* de aproximadamente 1140 pb. Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 4 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60°C, 2 minutos a 72 °C, e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,2%. O produto de amplificação desta reação foi utilizado numa segunda amplificação com os primers universais U968-GC e R1387 (HEUER, H. e SMALLA, K., 1997), para posterior análise de DGGE. Para amplificação destes os ciclos foram: desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 55 °C, 2 minutos a 72 °C, e uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,2%.

A análise em DGGE foi realizada no aparelho *phorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda), com gradiente desnaturante variando de 45 a 65% de desnaturação, onde 100% de desnaturação consiste na concentração de 7 Mol/L de uréia e 40% de formamida. Os géis foram submetidos a eletroforese por 16 horas a 100 V. Após a eletroforese o gel foi corado com SYBR Green I e fotodocumentado em luz ultravioleta.

O perfil de DGGE obtido foi analisado no programa GelComparII (Applied Maths, Bélgica), no qual as bandas foram identificadas e as áreas referentes a cada

banda foram quantificadas de maneira relativa ao total de área da amostra, permitindo a normalização e comparação entre as amostras.

A correlação dos dados ambientais com a ocorrência das bandas e suas intensidades foram determinadas pela Análise de Redundância (RDA), realizada no *software* Canoco (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda). As bandas observadas nos géis de DGGE foram consideradas como espécies de actinobactérias e suas intensidades relativas consideradas como frequência de ocorrência destas espécies. O teste estatístico de permutação de Monte Carlo foi aplicado considerando 499 permutações aleatórias, permitindo avaliar a significância (valor *p*), dos fatores ambientais na distribuição de espécies das amostras. Como fatores ambientais foram consideradas as localizações das amostras dentro dos manguezais (franja, centro e restinga) e a diferença entre os manguezais estudados (a contaminação por petróleo). Na RDA também foram obtidos os valores de λ_1 , que mostram as porcentagens de variância que podem ser explicadas pelos fatores ambientais considerados.

4.8 Avaliação do Potencial Antifúngico de Actinobactérias de Manguezais

Actinobactérias isoladas de manguezais, foram submetidos a uma triagem *in vitro* para seleção de actinobactérias produtoras de princípios ativos antifúngicos. Estas foram crescidas em meio de cultivo sólido BDA (item 1.1 do anexo). Após o crescimento das actinobactérias, os fitopatógenos *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora* sp. foram repicados na outra extremidade da placa para avaliação da inibição micelial. Após essa triagem, as actinobactérias que apresentaram maior inibição fúngica, foram selecionadas para avaliação da produção de metabólitos secundários.

4.9 Obtenção de Extratos Orgânicos de Actinobactérias

As actinobactérias, cultivadas em meio líquido Batata-Dextrose (BD) (item 1.2 do anexo), foram incubadas em shaker à 28 °C/10.000g por sete dias. Após o crescimento das mesmas, o meio foi centrifugado em centrífuga refrigerada SORVALL (10.000 g. a 28 °C), para obtenção dos componentes liberados durante o

metabolismo bacteriano no sobrenadante, sendo a biomassa descartada. Do sobrenadante, foram utilizadas alíquotas de 500 mL para as extrações com acetato de etila (200 mL) em funil de separação. Esse processo foi repetido três vezes para cada operação. As respectivas fases orgânicas foram reunidas e com o reagente sulfato de sódio anidro, a água restante foi retirada. Após a filtração e evaporação do solvente em evaporador rotatório, obteve-se os extratos brutos.

4.10 Atividade Biológica de Extratos Brutos de Actinobactérias

P. aphanidermatum e *Phytophthora* sp. foram repicados em meio BDA em placa à 25°C por 24 horas, separadamente. Após crescimento inicial, 15 µL dos extratos brutos eluidos em acetato de etila, obtidos das actinobactérias, foram aplicadas em discos S&S (diâmetro ¼ IN) autoclavados, previamente inseridos nas placas de Petri contendo os fitopatógenos. Após dois dias foi observada a formação de halos de inibição. O procedimento foi realizado em triplicata para cada um dos fitopatógenos em estudo. Os tratamentos controle receberam somente o solvente acetato de etila.

4.11 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pelo Método de Difusão em Gelose ou Método dos Discos:

Discos de papel impregnados com 5 µl dos extratos brutos produzidos pelos isolados MGE7 e AMC41 nas concentrações de 3 mg/ml e 14 mg/ml, foram disposto sobre a superfície de um meio gelosado de Mueller-Hinton (item 1.4 do anexo) previamente semeado com uma suspensão de *P. aphanidermatum* em fase exponencial de crescimento. A partir do disco, o metabólito secundário difundiu-se na gelose. Após a incubação do meio de cultura por 18 horas a 37 °C, verificou-se a inibição do crescimento micelial do *P. aphanidermatum* ao redor dos discos. A sensibilidade ou resistência do fitopatogeno deu-se em função do diâmetro do halo de inibição.

Para cada amostra, mediu-se o diâmetro do halo e assim, foi calculado o valor (aproximado) da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do agente antimicrobiano.

4.12 Análise dos Extratos Orgânicos por Métodos Cromatográficos

4.12.1 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada para avaliação analítica qualitativa dos componentes dos extratos brutos, utilizando-se cromatoplasas de sílica GF₂₅₄ em suporte de alumínio (MERCK®). Os extratos foram aplicados nas cromatoplasas na quantidade máxima de 10 µL, tendo sido aplicado o controle (extrato do meio de cultura) como referência. As manchas foram identificadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm e o cálculo dos R_fs (frente de retenção) foi realizado, segundo a seguinte equação:

$$R_f = \frac{\text{Distância do centro da mancha à linha de partida}}{\text{Distância da frente do eluente à linha de partida}}$$

A análise foi realizada observando-se a velocidade de migração dos constituintes da mistura que formaram “spots”, sendo caracterizados por valor numérico (R_f) que exprime a relação entre as distâncias percorridas pelo composto e pela frente da fase móvel.

4.12.2 Cromatografia em Coluna

Os extratos orgânicos produzidos pelos isolados MGE7 e AMC41 foram eluidos em metanol e fracionados em coluna de SEPHADEX-LH 20 (polímero gelatinoso). Das frações obtidas, fez-se cromatografia em camada delgada para que fossem agrupadas de acordo com a semelhança das frações, quando visualizadas em luz UV. A fase móvel utilizada foi o metanol, que quando estava passando através do adsorvente na coluna, arrastou consigo os componentes das amostras que estavam sendo cromatografadas.

4.12.3 Análise de Extratos Orgânicos pelo Método de Ionização por Electrospray

As análises pelo método de ionização por electrospray (ESI+ e ESI-) acoplado ao espectrômetro de massas foram realizadas através da infusão contínua de amostras, os extratos orgânicos produzidos pelas actinobactérias isoladas de manguezais. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas, sistema LC-MS e detector tripotquadropolo operando com interface electrospray em modo positivo e negativo (Varian®).

Esta metodologia possibilitou agrupar os microrganismos isolados com base na semelhança do perfil químico obtido para cada extrato, de uma maneira rápida e sensível.

4.13 Bioensaios de frações ativas

P. aphanidermatum foi repicado em meio BDA à 25 °C por 24 horas. Após crescimento inicial, 10 µL das frações obtidas após cromatografia em coluna, seguidas de agrupamento destas por meio de cromatografia em camada delgada, foram eluidas em acetato de etila e aplicadas em discos S&S (diâmetro ¼ IN) autoclavados, previamente inseridos nas placas de Petri contendo o fungo fitopatogênico. Após dois dias, foi observada a formação de halos de inibição. O procedimento foi realizado em triplicata para cada um dos fungos fitopatogênicos em estudo, sendo que houve triplicata com discos com 10 µL do solvente acetato de etila como controle.

Figura1: Fluxograma referente às metodologias utilizadas

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de Actinobactérias

A presença de actinobactérias em manguezais e em outros ecossistemas marinhos tem sido pouco documentada, embora esse grupo de microrganismos tenha sido encontrado abundantemente em diversos ecossistemas.

De acordo com Das, Lyla e Khan (2006), o ecossistema manguezal é um importante reservatório de actinobactérias produtoras de antibióticos, sendo o primeiro relato sobre produção de antibióticos por essas bactérias feito por Rosenfeld e Zobel em 1947.

Neste trabalho, foi possível obter 11 isolados da rizosfera de *R. mangle* do município de Cananéia-SP e apenas três isolados da rizosfera de *R. mangle* do manguezal de Bertioga – SP. Este pequeno número de isolados obtidos, quando comparados aos encontrados na rizosfera de culturas convencionais pode ser justificado pela baixa quantidade de oxigênio na rizosfera das plantas de manguezais, que são ecossistemas alagados. Dessa forma, supostamente por serem microrganismos com alta capacidade adaptativa, as actinobactérias conseguem sobreviver na região próxima às raízes das plantas que liberam o oxigênio oriundo do seu metabolismo no sedimento do manguezal.

Devido à baixa quantidade de isolados obtidos da rizosfera foram incluídas actinobactérias cedidas pela Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, sendo 12 isolados epifíticos do manguezal de Cananéia-SP (cinco de folhas de *Laguncularia* sp.; seis de folha *R. mangle* e um isolado de folha de *Avicenia* sp.), 13 isolados da rizosfera de *R. mangle* do manguezal de Maceió-AL e 11 de isolados de sedimentos de diferentes manguezais do nordeste brasileiro.

5.2 Avaliação da Biodiversidade de Actinobactérias de Manguezais:

5.2.1 Identificação de Actinobactérias utilizando o gene 16S DNAr.

As análises dos seqüenciamentos do gene 16S DNAr e as de caracterização morfológica, foi observado que os isolados de actinobactérias de manguezais pertencem ao gênero *Streptomyces*.

Não foi possível identificar todos os isolados já que os mesmos não apresentaram similaridade relevante com o banco de dados da biblioteca ACTINI 3.80 e Genbank. Apresentaram similaridade satisfatória após blast, 13 destes isolados (AMC16, AMC25, AMC3, L-3-24, L-3-28, R-2-17, R-2-4, A-1-9, MM2R2-1, MM3R-2, MMA-2.3, AMC1, AMB26), onde pode-se constatar as espécies dos microrganismos (índice de similaridade acima de 98), então, é suposto que os demais isolados pertencem a espécies ainda não descritas. Estas suposições deverão ser avaliadas por outras técnicas, como, por exemplo, hibridização DNA-DNA e Biolog.

Como pode ser observado, foi possível isolar neste trabalho as espécies *S. luridiscabiei*, *S. arenae*, *S. afghaniensis*, *S. cheonanensis*, *S. griseus*, *S. gobitricini*, *S. griseocarneus*, *S. thermocarboxydus*, *S. venezuelae* e *S. albofaciens*. Portanto, é importante destacar a grande abundância da espécie *S. luridiscabiei* na região de Cananéia. Já no manguezal de Bertioga, onde foram isolados apenas três linhagens, pode-se verificar a presença da mesma. (Tabela 3).

Esta é a primeira vez que a espécie *S. luridiscabiei* foi relatada em ecossistemas de manguezais. Anteriormente, tal espécie foi descrita como envolvida no processo de patogênese em plantas de batata (*S. tuberosum*) (DUCKHWAN et al., 2003). Esta evidencia pode sugerir que os mecanismos que promovem a doença na planta, como a degradação de compostos orgânicos pode auxiliar na sobrevivência e multiplicação desta espécie no manguezal. Isto se intensifica se considerarmos a baixa disponibilidade de nutrientes neste ambiente, o que confere as espécies capazes de degradar a matéria orgânica uma grande vantagem adaptativa.

Segundo Colwell (1997) aproximadamente 3.500 espécies de bactérias tem sido descritas sendo que as estimativas são que há por volta de 3 mil destas no mundo. Tradicionalmente, a taxonomia microbiana vem sendo conduzida por diversos testes bioquímicos, morfológicos, físicos, etc. para se caracterizar culturas de bactérias marinhas, porém, menos de 1% destas bactérias são cultiváveis em laboratório. Devido a essa limitação, a diversidade bacteriana pode ser determinada com uso de técnicas molecular (SURAJIT DAS e AJMAL KHAN, 2006).

A biodiversidade de actinobactérias tem sido estudada de diversos nichos do domínio marinho, como fundo do mar, praias, manguezais dentre outros. No entanto, em locais onde os sedimentos são mais quentes e pouco ácido tem sido verificado a maior diversidade de actinobactérias que na água (SURAJIT DAS e AJMAL KHAN, 2006).

Tabela 3: Identificação de actinobactérias de manguezais, análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME) do gene 16S rDNA .

Local da Coleta	CL ¹	Identificação	Técnica	IS ²
Bertioga SP	AMB12	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	AMB26	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	99.72
	22b	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
Cananéia SP	AERC-1	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	97.46
	AMC1	<i>Streptomyces arenae</i>	16S DNAr	100
	AMC16	<i>Streptomyces afghaniensis</i>	16S DNAr	99.72
	AMC23	<i>Streptomyces</i> sp.	16S DNAr	96.43
	AMC25	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	98.31
	AMC3	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	98.87
	AMC40	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	97.18
	AMC22	<i>Streptomyces</i> sp.*	FAME	-
	AMC24	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	AMC39	<i>Streptomyces</i> sp.*	FAME	-
	AMC41	<i>Streptomyces</i> sp.*	FAME	-
	L-3-10	<i>Streptomyces cheonanensis</i>	16S DNAr	95.45
	L-3-13	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	95.24
	L-3-24	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	99.44
	L-3-28	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	98.47
	L-2-6	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	R-2-17	<i>Streptomyces arenae</i>	16S rDNA	98.6
	R-2-4	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S rDNA	98.86
	R-2-7	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S rDNA	97.74
	R-3-11	<i>Streptomyces</i> sp.	16S rDNA	96.63
	R-2-6	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	R-2-9	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
Maceió AL	A-1-9	<i>Streptomyces griseus</i>	16S rDNA	98.06
	MM2A-2	<i>Streptomyces</i> sp.	16S rDNA	96.91
	MM2R2-1	<i>Streptomyces gobitricini</i>	16S rDNA	99.72
	MM2R-2	<i>Streptomyces griseocarneus</i>	16S rDNA	97.74
	MM3R-2	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	16S rDNA	98.59
	MMA2.3	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S rDNA	99.44
	MMA-3	<i>Streptomyces venezuelae</i>	16S rDNA	97.74
	MMA-2.1	<i>Streptomyces</i> sp.*	FAME	0,38

Tabela 3: Identificação de actinobactérias de manguezais, análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME) do gene 16S rDNA (continuação).

Local da Coleta	CL ¹	Identificação	Técnica	IS ²
Maceió AL	MM2R-2A	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	MMA-2	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	MMA-1.2	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	MMA-4	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	MMA3.1	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	MM2A-3	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
Outros Manguezais	MGE31	<i>Streptomyces arenae</i>	16S DNAr	98.53
	MGE7	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	16S DNAr	98.99
	MGE45	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	MSC408	<i>Streptomyces</i> sp.	16S DNAr	96.68
	MSC463	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	99.16
	MSC329	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	99.44
	MSC330	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	98.09
	MSC334	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	16S DNAr	98.88
	MSC433	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	MSC39	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-
	MSC426	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-

¹ CL – Código das linhagens;

² IS – Índice de similaridade;

* Caracterização taxonômica realizada com base na morfologia e por meio de análise do perfil de ácidos graxos da parede celular (FAME).

5.2.2 Caracterização Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura

Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostram a estrutura filamentosa dos isolados observados semelhantes às estruturas dos *Streptomyces*, que segundo Bradbury (1986), actinobactérias do gênero *Streptomyces* possuem micélio ramificado, são Gram-positivas, produzem cadeias de esporos, são heterotróficas e aeróbicas. De acordo com Flardh e Buttner (2009), este gênero pertencente ao filo das Actinobactérias apresenta características similares a dos fungos filamentosos. Ambos têm hifas ramificadas que formam um micélio vegetativo e esporos que são estruturas reprodutivas. Essas similaridades são resultados da adaptação de nichos ecológicos similares, apesar dos mecanismos serem de origem diferente. Como os fungos, a maioria dos *Streptomyces* vive como saprófitas no solo, apesar dos *Streptomyces* apresentarem sucesso em habitar uma vasta gama de outros nichos. Ambos são terrestres e aquáticos, e algumas linhagens são patogênicas a plantas ou animais.

Quando um esporo típico de *Streptomyces* encontra condições favoráveis e nutrientes, este germina e um ou dois tubos emergem e crescem para formar a hifa. Este tubo germinativo cresce por extensão e ramificação formando assim o micélio vegetativo. Em resposta a falta de nutrientes e outros sinais, produzem os metabólitos secundários assim como os fungos, iniciando então a diferenciação morfológica. As hifas aéreas quebram a tensão superficial, saindo a água do micélio vegetativo e cresce para o ar. As hifas aéreas começam se dividir controladas por uma forma de divisão celular em longas cadeias compartimentadas, que desenvolvem esporos com grossas paredes e com pigmento cinza, adquirindo a forma característica de maturidade (FLARDH e BUTTNER, 2009).

Fotos dos isolados ainda não identificados, quando comparadas com as apresentadas no Atlas de Actinobactérias descritas por Miyadoh *et al.*, (1997), mostraram que os isolados observados são pertencente ao gênero *Streptomyces*. Os isolados rizosféricos AMC24 e AMC40 (Figuras 2 A e B) possuem cadeias longas, não espiraladas, com esporos doliformes e rugosidade irregular, e MGE45 (Figura 2 D) possui cadeia de esporos longa e espiralada, esporos saculiformes e rugosidade irregular. Já no isolado R-2-7(Figura 2 C), não foi possível observar a formação de esporos, somente hifas não segmentadas com rugosidade irregular.

A linhagem AMC 41(Figura 3), ainda não identificada à espécie, apresenta hifas aéreas não segmentadas e pouco espiralada, os esporos são doliformes e não rugosos e a linhagem MGE 7 (Figura 4), identificada como *Streptomyces thermocarboxydus* também apresenta hifas aéreas não segmentadas, porém espiralada, esporos saculiformes, pilosos e não rugosos.

Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura dos isolados AMC24 (A), AMC40 (B), R-2-4 (C) e MGE45 (D).

Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem AMC41, *Streptomyces* sp., que apresentou morfologia característica do gênero ao qual este isolado pertence.

Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem MGE7, *Streptomyces thermocarboxydus*, que apresentou morfologia característica do gênero ao qual este isolado pertence.

5.3 Testes de Antagonismo e Antibiose

De todos os isolados obtidos e avaliados, 75% mostraram potencial em inibir os fitopatógenos *P. aphanidermatum* e *Phytophthora* sp. em teste de antagonismo *in vitro*, promovendo grandes halos de inibição (Figura 5). Estes fitopatógenos pertencentes ao Reino dos Chromistas são importantes agentes causadores de doenças em sistemas aquáticos. Do mesmo modo, a maioria dos isolados que apresentaram halo de inibição, também produziram antibióticos não-voláteis capazes de inibir o crescimento micelial desses fitopatógenos, observados nos testes de antibiose (Tabela 4). De acordo com Balasubramanian e Khan (2002), a presença de actinobactérias em ecossistemas de manguezais tem sido relacionada às variações sazonais destes ambientes. O número mais elevado das actinobactérias está presente nas regiões de monções (épocas de vento). Segundo os autores, a

atividade antagonica das actinobactérias foi mostrada contra 14 patógenos testados, sendo: *Vibrio anguillarum*, *V. cholerae*, *V. alginoliticus*, *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Salmonella-I*, *Salmonella-II*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Rhodotorula rubra*, *R. marina* e *Cladosporium*. Ainda, das 104 actinobactérias testadas no trabalho dos autores 56% apresentaram efeito antagonico contra bactérias Gram negativas e 36% contra Gram positivas e 100% dos isolados inibiram o crescimento de fungos filamentos, como *Cladosporium*.

Segundo Surajit Das e Ajmal Khan (2006) as actinobactérias marinhas constituem uma importante fonte de novos compostos ativos. Pois já que as condições do ecossistema marinho são completamente diferentes das condições “terrestres” estas produzem diferentes tipos de antibióticos.

Tabela 4: Avaliação da atividade antagonica e potencial antibiótico de actinobactérias isoladas de manguezais.

Código	Identificação	<i>Pythium aphanidermatum</i>		<i>Phytophthora sp.</i>	
		AT ¹	AB ²	AT ¹	AB ²
22b	<i>Streptomyces sp.</i>	++	+	+	+
AMC 1	<i>Streptomyces fulvorobues</i>	+++	++	+++	++
AMC 22	<i>Streptomyces halstedii</i>	+++	+++	+++	+++
AMC 23	<i>Streptomyces griseus</i>	++	++	+	+
AMC 24	<i>Streptomyces sp.</i>	+++	+++	++	+
AMC41	<i>Streptomyces rochei</i>	+++	+++	+++	+++
AERC-1	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	++	+	+	+
A-1-9	<i>Streptomyces griseus</i>	++	++	++	++
AMC16	<i>Streptomyces afghaniensis</i>	++	+	++	+
AMC26	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	++	++	++	++
AMC 39	<i>Streptomyces sp.</i>	+++	++	++	++
AMC40	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	++	++	++	++
L-2-3	<i>Streptomyces sp.</i>	+	+	++	-
L-3-10A	<i>Streptomyces niger</i>	++	++	++	++
L-3-24	<i>Streptomyces lavendulae</i>	+	+	++	++
L-3-28A	<i>Streptomyces halstedii</i>	+	-	+	+
L-2-6	<i>Streptomyces sp.</i>	+	+	++	++
L-3-13	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	++	+	+	+
R-2-7	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	+	+	+	+
R-2-17	<i>Streptomyces arenae</i>	++	+	++	+
MGE45	<i>Streptomyces sp.</i>	+	+	+	-
MGE 31	<i>Streptomyces sp.</i>	++	+	+	+
MGE7	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	+++	+++	++	-
MSC 329	<i>Streptomyces sp.</i>	++	-	+++	+++

Tabela 4: Avaliação da atividade antagonista e potencial antibiótico de actinobactérias isoladas de manguezais (continuação).

Código	Identificação	<i>Pythium aphanidermatum</i>		<i>Phytophthora sp.</i>	
MSC 330	<i>Streptomyces fulvorubens</i>	++	+	+	+
MSC 334	<i>Streptomyces sp.</i>	++	++	+	+
MSC 39	<i>Streptomyces sp.</i>	+	nd	++	++
MSC 408	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	-	-	+	nd
MSC 426	<i>Streptomyces sp.</i>	++	++	++	+
MSC 433	<i>Streptomyces sp.</i>	++	++	++	++
MSC 463	<i>Streptomyces halstedii</i>	+	+++	+++	++
R-2-4	<i>Streptomyces virginiae</i>	++	+	+++	++

Onde: +++ mais que 70% de inibição; ++ até 50% de inibição; + até 20% de inibição; - não houve inibição; nd: não testadas.

AT¹: Teste de antagonismo

AB²: Teste de antibiose

Figura 5: Teste de antagonismo. A- Controle positivo, crescimento pleno do patógeno; B- Inibição de *P. aphanidermatum* pela linhagem AMC1 de *Streptomyces fulvorubens* isolada do manguezal de Cananéia – SP.

5.4 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE)

A partir dos perfis de DGGE obtidos dos dois manguezais estudados pode-se observar a estrutura da comunidade de actinobactérias de maneira independente de cultivo. Além de suprir informações não consideradas quando apenas o isolamento é utilizado, esta análise fornece uma visão geral da comunidade em cada uma das amostras avaliadas.

Inicialmente, é possível observar a distinção das comunidades de actinobactérias presentes nos manguezais de Bertioga e de Cananéia. Esta diferença se deve provavelmente ao fato da contaminação por petróleo, que ocorre no manguezal localizado no município de Bertioga. É possível sugerir, que uma vez que ocorra tal contaminação, a comunidade microbiana deve ser responsiva a tais

alterações, e por consequência, a comunidade de Actinobactérias também seja modificada. No entanto, além desta diferença entre as localidades, uma variação entre as amostras obtidas em diferentes regiões do mesmo manguezal é encontrada. De acordo com Figura 6, os perfis obtidos em amostras de franjas diferem daquelas obtidos na área central do manguezal e da restinga. Tais diferenças são mais evidentes no manguezal de Cananéia, sugerindo que a seleção que ocorre devido à contaminação por óleo, no manguezal de Bertioga, é maior do que a seleção que ocorre devido a variações naturalmente encontradas dentro de um mesmo manguezal. Adicionalmente, observando que os pontos de franja mostram similaridade entre os dois manguezais amostrados, pode-se sugerir o efeito significativo das marés na composição da comunidade de actinobactérias na rizosfera de *R. mangle* que se desenvolvem na área de franja dos manguezais.

A análise de redundância, onde os fatores ambientais (localização da amostra dentro dos manguezais, e a presença de petróleo) foram correlacionadas, mostrou que os únicos fatores que mostraram significativa influência na composição na comunidade de *Actinobacteria* na rizosfera de *R. mangle* foram contaminação do manguezal e a proximidade com o mar. Ambos os fatores, revelaram por meio do teste de permutação de MonteCarlo, valores de $p=0,012$. No entanto, os valores de $\lambda-1$ mostram que as diferenças entre manguezais (contaminação) e proximidade com o mar, conseguiram explicar 15 e 17% da variação das comunidades, respectivamente, revelando um efeito pouco maior do mar sobre o fato da contaminação por petróleo. Assim temos que a comunidade de actinobactérias estudada responde aos fatores avaliados da seguinte maneira: maré>contaminação por petróleo. Estes fatores são de grande importância na fisiologia de comunidades microbianas, principalmente atuando na disponibilidade de oxigênio nos diferentes pontos de amostragem, e consequentemente nos ciclos biogeoquímicos, que suprem nutricionalmente as espécies microbianas ativas no ambiente. Em relação ao efeito da proximidade ao mar, podemos também inferir sobre a seleção realizada pela salinidade nestas comunidades, que parecem ser significativamente afetadas por tal fator.

Figura 6: Análise de DGGE mostrando a estrutura da comunidade rizosférica de actinobactérias em plantas de *R. mangle* localizadas nos manguezais de Bertioga e Cananéia. M indica os marcadores de corrida, enquanto que os nomes na figura identificam as amostras presentes em cada *fingerprinting*.

5.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O experimento foi realizado com os extratos brutos das linhagens AMC41 e MGE7 contra o fitopatógeno *P. aphanidermatum*. Foram feitos testes nas concentrações de 3 mg/mL e 14 mg/mL. A concentração de 3 mg/ml do extrato bruto AMC41 formou uma média de halo de inibição micelial de 2,3 cm de diâmetro. Já o extrato MGE7 não apresentou inibição nessa concentração, apenas na concentração de 14 mg/ml com media de halo de 1,6 cm de diâmetro (Figura 7). Porém ambos se mostraram promissores devido à baixa concentração da amostra necessária para que haja inibição do micélio do fitopatógeno em teste.

Figura 7: Formação do halo de inibição micelial de *P. aphanidermathum* nas concentrações de 3mg/ml e 14mg/ml do extrato bruto de AMC41 e MGE7.

5.6 Cromatografia em camada Delgada (CCD)

Onze extratos brutos (AMC1, MSC433, MSC330, MSC334, 22b, MSC463, R-2-4, AMC22, L3-10A, MGE 7 e AMC 41) foram submetidos a um minucioso estudo por cromatografia em camada delgada (CCD) com diferentes sistemas de solventes, na tentativa de otimizar a separação dos compostos presentes. Em função de todas estas interações entre amostra/fase móvel/fase estacionária, o sistema foi otimizado para cada amostra, separadamente. Dos ensaios realizados em CCD os solventes que apresentaram melhor resolução foi a mistura de eluentes diclorometano/metanol (9,7:0,3) para nove das amostras, sendo a melhor mistura para AMC41, hexano e acetato de etila (3:7) e acetato de etila, hexano e metanol (7: 1,5: 1,5) para a amostra MGE7. Na técnica de CCD pôde-se constatar a presença de “spots” nas amostras visíveis sob lâmpada UV nos comprimentos de onda a 254 nm e 366 nm e calculadas suas distâncias de migração (Tabela 5).

Tabela 5: Rfs das frações visualizadas sob lâmpada UV com dois comprimentos de onda 254/366 nm.

Extratos	Identificação	Rf 1	Rf 2	Rf 3	Rf 4	Rf 5	Rf 6	Rf 7
AMC1	<i>S. arenae</i>	0,6	0,1					
MSC433	<i>Streptomyces</i> sp.	0,62	0,58	0,35	0,23	0,15	0,12	0,05
MSC330	<i>S. luridiscabiei</i>	0,6	0,1	0,06				
MSC334	<i>S. luridiscabiei</i>	0,26	0,13					
22b	<i>Streptomyces</i> sp.	0,26	0,03					

Tabela 5: Rfs das frações visualizadas sob lâmpada UV com dois comprimentos de onda 254/366 nm (continuação).

Extratos	Identificação	Rf 1	Rf 2	Rf 3	Rf 4	Rf 5	Rf 6	Rf 7
MSC463	<i>S. luridiscabiei</i>	0,6	0,3	0,2	0,1			
R-2-4	<i>S. luridiscabiei</i>	0,4						
AMC22	<i>S. halstedii</i>	0,9	0,75	0,6	0,53	0,3	0,2	0,05
L3-10A	<i>S. cheonanensis</i>	0,83	0,6	0,3	0,2	0,1		
MGE 7	<i>S. thermocarboxydus</i>	0,68	0,54	0,06				
AMC 41	<i>Streptomyces</i> sp.	0,7	0,59	0,49	0,4	0,35	0,28	0,14

5.7 Cromatografia em coluna

Os extratos brutos obtidos em acetato de etila foram fracionados em coluna de SEPHADEX-LH 20 (polímero gelatinoso), usando metanol como eluente. Do extrato orgânico da linhagem MGE 7 (Figura 6), foram obtidas 26 frações e do AMC 41, 27 frações. Assim, foi realizado cromatografia em camada delgada com todos as frações para que estas fossem agrupadas de acordo com a semelhança entre os Rfs dos “spots”, quando visualizadas em luz ultra-violeta nos comprimentos de onda de 254 e 355 nm. Assim, obteve-se seis frações do MGE 7 e oito do AMC 41.

5.8 Bioensaio com as frações obtidas dos extratos orgânicos

As 14 frações obtidas por meio da Cromatografia em Coluna foram testadas contra os fitopatógenos para detecção das frações ativas. Das seis frações do extrato MGE7, duas (frações 4 e 5) inibiram o crescimento micelial dos patógenos e das oito frações do extrato AMC41, três frações (frações 2, 3 e 8) apresentaram inibição.

5.9 Análise por Electrospray dos Extratos Orgânicos das Actinobactérias

A Figura 8 mostra o perfil químico dos extratos orgânicos obtidos por fermentações das respectivas actinobactérias por meio de espectrometria de massas empregando ionização por electrospray e infusão direta. Existe uma grande diversidade de metabólitos secundários para cada extrato analisado, como sugere

Como observado, nos espectros, existe regiões de massas que se repetem com certa frequência. O sinal de m/z 1149, aparece nos espectros dos extratos que apresentaram atividade positiva contra os fitopatógenos *P. aphanidermatum* e *Phytophthora* sp. Sugerindo então que esta é a massa do composto ativo.

Figura 8: Perfil químico dos extratos orgânicos obtidos pela fermentação das actinobactérias, analisados por espectrometria de massas empregando ionização por electrospray.

Assim, foram realizadas buscas nos bancos de dados Dictionary of Natural Productus e Chemical Abstract, por compostos de massas de 1148 a 1149. Os resultados obtidos estão apresentados na figura abaixo (Figura 9).

Name	Molecular Formula
Spodoptera frugiperda Allatotropin 2	C ₄₉ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S
Berninamycin A, 9C; Dihydro	C ₅₁ H ₅₃ N ₁₅ O ₁₅ S
α-L-Fucopyranosyl-(1→3)-[β-D-galactopyranosyl-(1→4)]-2-amino-2-deoxy-D-glucose; α-Pyranose-form, Benzyl glycoside, 2',3',4',6-tetrabenzyl, 2N,2'',3'',4'',6''-penta-Ac	C ₈₃ H ₇₃ NO ₁₉
α-L-Fucopyranosyl-(1→4)-[β-D-galactopyranosyl-(1→3)]-2-amino-2-deoxy-D-glucose; β-Pyranose-form, Benzyl glycoside, 2',3',4',6-tetrabenzyl, 2N,2'',3'',4'',6''-penta-Ac	C ₈₃ H ₇₃ NO ₁₉
NS Antibiotic complex; NS8	C ₄₃ H ₇₃ NO ₃₄
NS Antibiotic complex; NS9	C ₄₃ H ₇₃ NO ₃₄

Figura 9: Resultado da busca pelos compostos de massa molecular 1148 a 1149 Da.

Seis compostos foram reportados como resultado desta busca. Os três antibióticos produzidos por *Streptomyces* encontrados no banco de dados estão destacados na figura. Destes o antibiótico Berninamicina A, atua contra bactérias Gram positivas, já os outros dois antibióticos complexos NS8 E NS9 apresentaram atividade inibitória das enzimas α-amilases, as quais são importantes no desenvolvimento e sobrevivência dos fungos, bactérias e insetos. Os mecanismos de interação e especificidade dos inibidores com as α-amilases são complexos e ainda não elucidados completamente. Uma vez que esta enzima é inibida, a assimilação de nutrientes é reduzida e consequentemente seu desenvolvimento é afetado (JUNIOR MARSARO et al., 2005). Este pode ser o mecanismo pelo qual está ocorrendo a inibição do crescimento micelial dos patógenos. Porém não se pode afirmar que o composto produzido pelas linhagens ativas seja um dos citados acima, já que para isso, precisa-se de um espectro de fragmentação das mesmas para haver comparação dos parâmetros com os descritos na literatura.

6 CONCLUSÃO

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

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

- Os fitopatógenos *P. aphanidermatum* e *Phytophthora* sp. tiveram o crescimento micelial inibido por aproximadamente 63% das actinobactérias avaliadas;

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CURY, J. C. Atividade Microbiana e Diversidade Metabólica e Genética em Solo de Mangue Contaminado com Petróleo. 84f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo. Piracicaba – SP. 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LECHEVALIER, H. A. & LECHEVALIER, M. P. Introduction of the other Actinomycetales. In: STARR, M.P., STOLP, H., TRUPER, H.G., BALOW, A., SCHLEGEL, H.G. **The prokaryotes**:

a handbook on habitats, isolation and identification of bacterial. Berlin: Springer-Verlag, 2 v. 1915 – 2123 p. 1981.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PRUDHOMME, J.; McDANIEL E.; PONTS, N.; BERTANI, S.; FENICAL, W.; JENSEN, P.; LE ROCH, K. Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, 151 v., 167-177 p. 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXOS

1 Meios de Cultivo

1.1 Meio Batata Dextrose Ágar (BDA)

Glucose	20 g
Ágar	16 g
Caldo de Batata.....	200 ml
Água destilada.....	1000 ml

1.2 Batata Dextrose (BD)

Glucose	20 g
Caldo de Batata.....	200 ml
Água destilada.....	1000 ml

1.3 Meio Amido Caseína Ágar (ACA)

Amido	10 g
Caseína	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g

Ágar 16 g
Água destilada..... 1000 ml

1.4 Meio Gelosado de Mueller-Hinton

Amido 1,5 g
Hidrolisado Acido de Caseína 17,5 g
Extrato de Carne 2,0g
Ágar 16 g
Água destilada..... 1000 ml