

BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS

MARCELA G. TEODORO¹; SHIRLEY SCRAMIN²; FLÁVIA M. P. MELO³; ITAMAR S. MELO²

N^o 0207014

Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna, SP – CP 69, CEP 13.820-000

Resumo

Actinobactérias rizosféricas, têm mostrado grande potencial na produção de metabólitos bioativos, sendo o gênero das *Streptomyces* o mais bem estudado e com melhor potencial para produção destes compostos. Assim, o presente trabalho visou realizar a bioprospecção de actinobactérias rizosféricas e avaliar o potencial de seus metabólitos bioativos no controle de bactérias patogênicas. Foram isoladas linhagens de actinobactérias de plantas saudáveis de milho, cultivado em diferentes regiões edafoclimáticas do Estado de São Paulo. As linhagens foram avaliadas quanto ao potencial de controle de *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os isolados que se mostraram eficientes em testes de antagonismo foram utilizados em ensaios de antibiose para verificação do potencial do composto bioativo no controle destes patógenos. Foram isolados 60 actinobactérias, identificadas morfológicamente como sendo do gênero *Streptomyces*. Dentre estas, 31 inibiram pelo menos 1 dos 5 patógenos em testes de antagonismos. Nos ensaios de antibiose, foi verificada a eficiência dos metabólitos de 25 actinobactérias no controle dos patógenos testados.

Abstract

Actinobacteria from rhizosphere have shown great potential in bioactive metabolites, and the genera *Streptomyces* has been used in the industry for production of pharmacological compounds. Thus, the present work aimed to study the diversity of actinobacteria from

1. Orientada: Graduação em Biologia, PUCCAMP, Campinas-SP, marcela.galo1@terra.com.br

2. Orientador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP

3. Colaborador: Doutoranda em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

rhizosphere of corn and to evaluate the potential of its metabolites against pathogenic bacterial. It was isolated 60 actinobacteria strains of healthy corn plants, from different regions of the São Paulo, all of their the belongs the genera *Streptomyces*. The strains had been evaluated on the potential in control *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The strains with positive response in antagonism assays were used in antibiose assay for bioactive metabolites against pathogens, amongst which 31 had inhibited at least 1 of the 5 pathogens in antagonism tests. In the antibiose assays, the efficiency of 25 strains metabolites, against the pathogens tested, was verified.

Introdução

A rizosfera é um micro-habitat biologicamente complexo e distinto no ecossistema terrestre, onde ocorre uma elevada densidade populacional e grande diversidade de microrganismos saprofíticos em decorrência do seu alto teor de matéria orgânica. Actinobactérias apresentam uma ativa função na decomposição da matéria orgânica destacando-se entre a microbiota rizosférica. (VALOIS *et al.*, 1996).

A alta densidade populacional e a diversidade de actinobactérias rizosféricas são de grande importância para esse micro-habitats, uma vez que podem influenciar o crescimento da planta e proporcionar proteção contra invasão de microrganismos patogênicos na raiz (CRAWFORD *et al.*, 1993).

A predominância de *Streptomyces* no solo só é significativa quando os nutrientes disponíveis são metabolizados e começam a ser limitantes, havendo diminuição da pressão dos competidores mais efetivos. Dessa forma, degradam substâncias normalmente não decompostas pelas populações de fungos e outras bactérias, como celulose, hemiceluloses, fenóis, quitina, queratina, ligninas e húmus (MELO; AZEVEDO, 1998).

As actinobactérias têm recebido atenção especial devido à produção de diversas substâncias de aplicação farmacológica e industrial, incluindo antibióticos, enzimas, inibidores enzimáticos e agentes imunomoduladores. *Streptomyces* é o gênero mais bem estudado, em termos biotecnológicos, dentre os membros da família Actinomycetales. Desde a segunda metade do século XX, cerca de 50.000 produtos naturais provenientes de

microrganismos foram informados, dos quais 10.000 são biologicamente ativos e mais de 8.000 são agentes antibióticos e antitumorais (LEIVA *et al.*, 2005).

Bactérias têm a habilidade de adquirir e transmitir genes de resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. Esse tipo de resistência vem aumentando continuamente nos últimos anos (COHEN, 1992), mesmo com a produção de grande variedade de diferentes antibióticos pelas indústrias químicas e farmacêuticas. O surgimento de bactérias resistentes a antibióticos pode ser considerado como manifestação natural motivada pela evolução da adaptação genética de organismos a mudanças no seu meio ambiente (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Os mecanismos de resistência de maior importância em bactérias gram-positivas já descritos podem ser classificados em três grupos: destruição do antibiótico (resistência a dalfopristina e penicilinas), efluxo contínuo do antibiótico (resistência a tetraciclinas e fluoroquinolonas) e reprogramação e modificação da estrutura-alvo (resistência à eritromicina e vancomicina). Utilizando um desses mecanismos, ou uma combinação deles, cepas de bactérias vem sobrepujando até os antibióticos mais promissores, independente da classe química a qual pertencem (SILVERMAN, 1992).

Portanto, a busca de novos antibióticos capazes de controlar bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos já conhecidos torna-se necessária e desejável, principalmente em regiões, culturas e ambientes pouco explorados, a exemplo da rizosfera do milho.

Material e Métodos

Raízes de plantas de milho (*Zea mays* L.) foram coletadas de diferentes regiões no Estado de São Paulo: Socorro, Serra Negra, Ribeirão Preto e Ibiúna. As amostragens foram feitas ao acaso, considerando 10 plantas de milho dentro da área da cultura.

Para o isolamento, 1g de solo rizosférico de cada planta foi suspenso em 9mL (1:10) de água destilada esterilizada. As amostras foram submetidas a uma diluição em série em solução salina (10^{-1} a 10^{-5}). De cada diluição foi retirada alíquota de 100µL e semeada em placas contendo o meio seletivo ACA (amido-caseína-água). As culturas foram incubadas a 28°C por até 30 dias (KÜSTER; WILLIAMS, 1964). Após o processo de isolamento, as colônias foram purificadas pelo método de esgotamento, em meio de cultivo sólido ACA.

Testes de antagonismo contra bactérias patogênicas (*Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) foram realizados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Em cada placa foi inoculada uma actinobactéria e perpendicularmente as bactérias patogênicas. As placas foram mantidas em câmara climatizada por 96 horas a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo avaliadas diariamente e medido o halo de inibição. As actinobactérias que apresentaram melhores resultados foram cultivadas em meio líquido BD (batata-dextrose) e incubadas em shaker a 28°C , 150 rpm por 7 dias. Após, a cultura foi centrifugada, seguida da extração dos metabólitos bioativos utilizando solvente orgânico (acetato de etila), posteriormente evaporado em evaporador rotatório, para obtenção dos extratos brutos (MELO; SANHUEZA, 1995). Os extratos brutos foram utilizados para testes de antibiose, aplicadondo-se 20 μL de cada extrato em discos S&S (diâmetro $\frac{1}{4}$ IN), previamente inseridos em placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram semeadas com as bactérias patogênicas testadas e foi analisado a formação de halos de inibição.

Resultados e Discussão

Foram isoladas 60 actinobactérias da rizosfera de milho, dentre as quais 31 apresentaram nos teste de antagonismo, habilidade em inibir o crescimento de pelo menos um dos patógenos testados, destacando-se os isolados 20, 29, 34, 40, 53 e 55 que inibiram o crescimento de quatro patógenos e, em especial, as linhagens 27 e 31 que se mostraram eficientes na inibição de todos os patógenos testados. (Tabela 1)

TABELA 1: Avaliação da atividade antagonônica e do potencial antibiótico dos extratos brutos das actinobactérias isoladas da rizosfera de milho.					
Código	<i>B. megaterium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
1	-	-	-	++	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	++	-	+
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	++	++	-	+	-
10	-	-	-	-	-
11	-	++	-	++	-
12	-	-	-	-	-
13	-	++	-	++	-
14	-	++	-	-	-
15	++	++	-	++	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-

18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-
20	++	++	++	-	++
21	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-
23	-	++	++	-	-
24	-	-	-	-	-
25	-	++	++	++	-
26	-	++	++	++	-
27	++	++	++	+	++
28	-	-	-	-	-
29	++	++	++	-	++
30	-	-	-	-	-
31	++	++	++	+	++
32	-	++	-	++	-
33	-	-	-	++	-
34	-	++	++	++	++
35	-	-	-	-	-
36	++	++	-	++	-
37	++	++	-	+	-
38	-	++	-	-	-
39	-	-	-	-	-
40	-	++	++	++	++
41	-	++	-	-	-
42	++	++	-	+	-
43	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-
49	-	++	-	-	-
50	-	-	++	++	+
51	-	-	-	-	-
52	-	++	-	-	-
53	-	++	++	++	++
54	-	-	-	-	-
55	++	++	++	-	++
56	-	-	-	-	-
57	-	+	-	-	-
58	-	-	-	-	-
59	-	-	+	+	+
60	-	+	-	-	-

Onde: - = negativo; + = positivo para antagonismo; ++ = positivo para antagonismo e antibiose.

Com relação ao teste de antibiose, onde foram testados os extratos brutos das 31 actinobactérias previamente selecionadas, 25 apresentaram halo de inibição para um ou mais patógenos testados. Observou-se a necessidade de teste de extração dos metabólitos com solventes de diferentes polaridades, visto que apenas parte dos microrganismos que apresentaram resultados positivos nos testes de antagonismo, foram eficazes nos teste de antibiose.

Pelas características morfológicas, micro e macroscópica observadas, todas as linhagens pertencem ao gênero *Streptomyces*.

As actinobactérias selecionadas mostraram-se promissoras para estudos futuros relacionados à produção de metabólitos secundários com atividade antibiótica, sendo estas possivelmente interessantes para o controle de patógenos. Faz-se necessário, portanto, estudos complementares para caracterização destes compostos.

Referências Bibliográficas

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. *Science*, v.257, p.1050, 1992.

CRAWFORD, D.L.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M.; OUSLEY, M.A. Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.3899-3905, 1993.

KÜSTER, E. & WILLIAMS, S.T. Selection of media for the isolation of streptomycetes. *Nature*. v.202, p.928-929, 1964.

LEIVA, S.P.; YANEZ, M.S.; ZAROR, L.C. *et al.* Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. . *Rev. méd. Chile*. [online]. fev. 2004, vol.132, no.2, p.151-159 [citado 21 Setembro 2005]. Disponível na World Wide Web: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003498872004000200003&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0034-9887.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Controle Biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.1, p. 262, 1998.

MELO, I.S. de; SANHUEZA, R.M.V. *Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: manual técnico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.72, 1995.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, L.C.; SÁ, M.M.; TERENCE, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana, *Quim. Nova*, v.29, No.4, p.844-855, 2006.

SILVERMAN, R. B.; *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press: Washington, p.5, 1992.

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

VALOIS, A.C.; SALOMÃO, A.N.; ALLEN, A.C. (org.) *Glossário de recursos genéticos vegetais*. Brasília: Embrapa – SPI (EMBRAPA/CERNAGEN), p.62, 1996.