



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

BIODIVERSIDADE DE ACTINOBACTÉRIAS DO SOLO DA CAATINGA PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS

Laura Poggi **Teixeira**^{1a}; Suikinai Nobre **Santos**^{2b}, Itamar Soares de **Melo**^{2c}

¹ Faculdade de Jaguariúna – Curso de Engenharia Ambiental; ² Laboratório de Microbiologia Ambiental – Embrapa Meio Ambiente

Nº 13407

RESUMO – Actinobactérias são bactérias gram-positivas e constituem boa parte da população microbiana do solo. Este trabalho teve como objetivo estudar as actinobactérias do solo do Bioma Caatinga, a fim de descobrir espécies que forneçam controle biológico dos fungos *Pyricularia grisea* e *Pythium aphanidermatum*, responsáveis por causar doenças em plantas. Do total de isolados obtidos, 14 obtiveram resultado no controle destes fungos, e 2 já foram identificados. Destes 2, um apresenta-se como provável espécie nova, e está sendo objeto de estudo aprofundado. Este trabalho mostra como é importante preservar a Caatinga, pois no seu solo vivem microrganismos que podem ser capazes de desempenhar resultados positivos tanto na agricultura quanto na indústria.

Palavras-chaves: Actinobactérias, controle biológico, fungos, Caatinga

^a Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia Ambiental, FAJ, Jaguariúna/SP, laura.teixeira@yahoo.com.br

^b Colaboradora: Pós-doutoranda LMA, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna/SP suikinai@yahoo.com.br

^c Orientador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna/SP, itamar.melo@embrapa.br



ABSTRACT- *Actinomycetes are gram-positive bacteria and constitute a large part of the soil microbial population. This work aims to study the soil actinomycetes from the Caatinga, in order to discover species that provide biological control of Pyricularia grisea and Pythium aphanidermatum, fungi responsible for causing diseases in plants. Of the total isolates, 14 obtained result in control of these fungi, and 2 have been identified. Of these two, one is presented as probable new species, and is being studied depth. This work shows how important it is to preserve the Caatinga, as in its soil lives microorganisms that might be able to perform positive results in both agriculture and industry.*

Key-words: Actinomycetes, biological control, fungi, Caatinga

1 INTRODUÇÃO

Filho, Romeiro & Garcia (2008) descrevem actinobactéria como “organismos percentences ao domínio Bacteria, gram-positiva, de crescimento filamentosos, podendo formar pseudomicélio, sendo algumas espécies formadoras de endósporos. No solo, sua presença é menor que a de bactérias, mas é maior do que a de fungos. Os gêneros mais comuns são *Streptomyces*, *Norcardia* e *Micromonospora*. Esses microrganismos são importantes devido à sua capacidade de produção de metabólitos secundários, responsáveis pela degradação de diferentes compostos orgânicos. (VASCONCELLOS et al., 2010).

O presente trabalho teve como objeto de estudo algumas actinobactérias do solo do Bioma Caatinga no controle dos fungos *Pythium aphanidermatum* e *Pyricularia grisea*. O fungo *Pyricularia grisea* é conhecido como o fungo causador da brusone do arroz e do trigo, fitopatologia que causa manchas de cor marrom na planta e pode leva-la à morte. (CRUZ et al. 2011 e MALAVOLTA et al. 2008). Já o *Pythium aphanidermatum* pode causar podridão nas raízes das plantas, o que pode provocar o tombamento das mesmas. (PINTO et al, 2010 e LUCON, AKAMATSU & HARAKAVA, 2008). Muitas culturas são afetadas por este fungo, entre elas o algodão, alface, milho, soja, tomate, e também algumas espécies de flores como a gérbera, begônia e violeta. Tendo em vista que esse é um bioma exclusivamente brasileiro, com um patrimônio biológico não encontrado em nenhum outro lugar do mundo (MMA, 2011), é indispensável o conhecimento do potencial biológico que ele oferece. Assim, podem ser feitas novas descobertas no campo da Microbiologia, bem como em outros campos, e também garantir a preservação e conservação desse importante ecossistema.



2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de coleta

O local de coleta das amostras de solo foi delimitado pela região da Caatinga do semiárido nordestino, nas proximidades do município de Petrolina, no Estado de Pernambuco (9° 23' 34" S 40° 30' 28" W), pós período de estiagem, em outubro de 2011. De acordo com análises físico-químicas, o solo era arenoso, com alta concentração de sais.

A coleta foi realizada de acordo com os padrões internacionais incluindo as coordenadas geográficas. As amostras foram coletadas em sacos plásticos, acondicionadas e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, onde foi realizado o isolamento dos microrganismos.

2.2 Isolamento e preservação das actinobactérias do solo da Caatinga

Para o isolamento das actinobactérias, seguiu-se a metodologia descrita por KAVAMURA et al. (2012): cerca de 1g do solo foi pesado e transferido para Erlenmeyers de 250 mL com 10 mL de tampão (0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,14% Na₂HPO₄; 0,024% KH₂PO₄) (ARAÚJO et al., 2002 apud KAVAMURA et al., 2012). À essa solução foram acrescentadas pérolas de vidro e as amostras foram submetidas ao ultrassom (Ultracleaner 1400A) por 30 segundos e agitação a 150 rpm, durante 1 hora. Após incubação, foram realizadas diluições seriadas de 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ seguida de retirada de alíquotas de 100 µL das diluições adequadas que foram semeadas em meio de cultura apropriado feito com glicose, extrato de levedura e ágar (GY).

2.3 Teste de antagonismo

Para o teste de antagonismo, são feitas quatro estrias nos cantos opostos de uma placa de petri de 9cm de diâmetro, cada uma dessas estrias proveniente de um isolado de actinobactéria diferente. Após essas actinobactérias apresentarem crescimento, um pequeno pedaço circular do fungo foi retirado do meio de cultura em que este estava inoculado e colocado no centro da placa, conforme ilustrado na Figura 1. Os fungos utilizados foram o *Pythium aphanidermatum* e *Pyricularia grisea*. O objetivo deste teste é identificar quais actinobactérias inibem o crescimento do fungo.

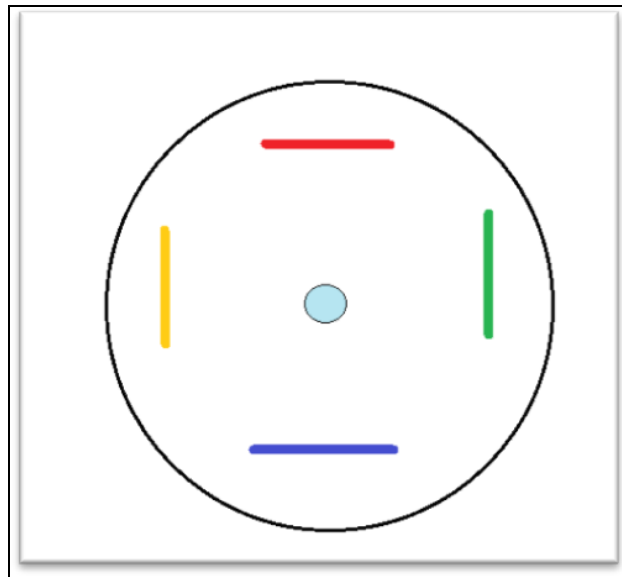


Figura 1. Teste de antagonismo

2.4 Obtenção dos metabólitos secundários: cultivo, filtração e obtenção dos extratos brutos do isolado Caatinga 168

A linhagem Caatinga 168 foi inoculada em 1 L de caldo BD (caldo de batata, glicose, extrato de levedura e peptona), e incubada a 26°C por 7 dias, a agitação de 180 rpm. Após o crescimento, o caldo de culturas foram submetidos ao sistema de filtração a vácuo (Sartorius), com membrana de celulose de 0,45µm (Milipore), e centrifugação a 9000rpm por 30 min a 4°C para retirada das células. O filtrado foi submetidos, por três vezes, ao processo de extração líquido-líquido em sistemas de duas fases (SDF), com o solvente diclorometano na proporção de 1:1(v/v) onde houve a formação de duas camadas: uma aquosa, na parte inferior e outra orgânica, na parte superior. Foi adicionada à fase orgânica 5% de sulfato de sódio anidro, filtrada em papel Whatman nº4 e concentrada no evaporador rotativo (Quimis) a temperatura de 45°C, à pressão reduzida (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001). O extrato bruto obtido foram pesado em balança analítica e armazenado em freezer a -20°C. O extrato bruto seco do controle negativo foi obtido através da extração do caldo de cultura sem inóculo.

2.5 Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da Caatinga 168

Para avaliar o potencial antimicrobiano dos compostos produzidos pela Caatinga 168, os extratos brutos foram submetidos a avaliação em difusão em disco contra a bactéria patogênica



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

humana *Staphylococcus equis* CCMA1189, e a levedura patogênica humana *Candida sp.* CCMA 224. Os microrganismos testes foram obtidos a partir da coleção de cultura de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna, São Paulo, Brasil. Todas as linhagens bacterianas e de levedura foram crescidas em meio de cultura respectivamente em ágar nutriente (NA) e Agar dextrose batata (BDA), a 28°C por 24h para linhagens bacterianas e até 4 dias para a levedura. Com auxílio de uma alça bacteriológica foram colhidas colônias bacterianas isoladas e ressuspensa em solução salina a 0,85%, a fim de se obter uma turvação correspondente com a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para tanto, foi utilizado um aparelho espectrofotométrico (A-Just TM- Abbot, Chicago, EUA) em absorvância de 625nm. Após a homogeneização dos inóculos foram retiradas 100 μ L da suspensão, plaqueados em NA e semeadas com auxílio de um swab estéril. Em discos de papel estéreis foram impregnados 5 μ L da suspensão dos extratos brutos ressuspensados em DMSO (dimetilsulfoxido) e aplicação destes foi feita com auxílio de uma pinça estéril para evitar contaminação. Após o período de incubação, foi realizada a leitura com o auxílio de um halômetro, utilizando fonte de luz refletida para iluminar a placa invertida sobre um fundo preto e opaco dos halos de inibição.

2.6 Identificação de isolados

Para a identificação, os isolados foram crescidos em 10 mL de meio líquido GY (glicose e extrato de levedura), que após um período de 10 dias incubados em agitação e a uma temperatura de 28°C foram centrifugados a 14000 x g por 5 minutos a fim de se obter pellets. Esses pellets foram submetidos à extração de DNA genômico, feito com o protocolo para bactérias gram-positivas do Kit Invitrogen (PureLink, Life Technologies). A integridade do DNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0%. A sequência de pares de base foi analisada pelo site Ez-taxon, que informou a quantidade de pares de base de cada amostra, bem como o nome da espécie e o percentual de similaridade do isolado com a espécie apontada. O DNA obtido foi submetido a PCR, purificação, reação de sequenciamento e precipitação. O sequenciamento foi feito utilizando cinco primers. As sequências obtidas foram checadas usando o programa FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc), e as três melhores foram unidas usando o programa BioEdit 7.1.3.0. As sequências foram comparadas com as sequências do banco de dados Ez Taxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>).



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados um total de 236 linhagens de actinobactérias do solo da Caatinga do semiárido brasileiro. De acordo com os teste de antagonismo microbiano 14 isolados apresentaram atividade antifúngica contra *Pythium aphanidermatum* e a *Pyricularia grisea* com atividades variando entre fraca (0,5 a 1 cm, indicada com o sinal +), moderada (1,0 a 2,0 cm, indicada com o sinal ++) e forte (acima de 2 cm, indicada com o sinal +++), como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens de actinobactérias isoladas do solo da Caatinga do semiárido brasileiro

Isolado	Origem	<i>Pyricularia grisea</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>
Caatinga 04	Solo	+	++
Caatinga 24	Solo	+	++
Caatinga 26	Solo	+	++
Caatinga 27	Solo	+	+
Caatinga 32	Solo	+	+
Caatinga 63	Solo	+	++
Caatinga 79	Solo	+	+
Caatinga 88	Solo	+	+
Caatinga 138	Solo	+	+
Caatinga 140	Solo	+	+
Caatinga 168	Solo	+	+++
Caatinga 211	Solo	+	+
Caatinga 219	Solo	+	++
Caatinga 234	Solo	+	+

De acordo com os dados obtidos, a avaliação do teste de atividade antagonista das actinobactérias contra a linhagem fitopatogênica *P. aphanidermatum*, mostrou que 57% das linhagens apresentaram leve atividade, 35% apresentaram atividade moderada e apenas uma linhagem (Caatinga 168) apresentou forte atividade antifúngica com halo de inibição acima de 2 cm. Diante disto, esta linhagem foi selecionada e submetida à produção dos compostos em caldo



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

fermentativo para estudo do potencial antimicrobiano. Além disso, todas as linhagens apresentaram leve atividade antimicrobiana contra o fungo fitopatogênico *P. grisea*.

A linhagem Caatinga 168 foi identificada como *Streptomyces cuspidosporus*, como mostra a Tabela 2. De acordo com ensaio de difusão em disco contra patógenos humanos, foram visualizados halo de inibição 20 mm para *S. equis* e 16 cm para *Candida sp*. Isto indica que os compostos presentes no extrato bruto da linhagem Caatinga 168 *S. cuspidosporus* apresentaram atividade antimicrobiana para todos os microrganismos teste utilizados neste estudo, são ativos contra procariotos (bactérias) e eucariotos (fungo e leveduras) apresentando amplo espectro de ação. Este trabalho exemplifica o potencial biológico dos compostos provenientes de microrganismos associados a ecossistemas extremófilos como a Caatinga, os mesmo funcionando como fonte natural para moléculas alvos de interesse industrial e agrícola.

Tabela 2. Isolados de actinobactérias identificados

Isolado	Pares de base	Espécie	% de similaridade
Caatinga 140	1016	<i>Streptomyces chromofuscus</i> NBRC 12851(T)	98,61
Caatinga 168	1373	<i>Streptomyces cuspidosporus</i> NBRC 12378(T)	98,1

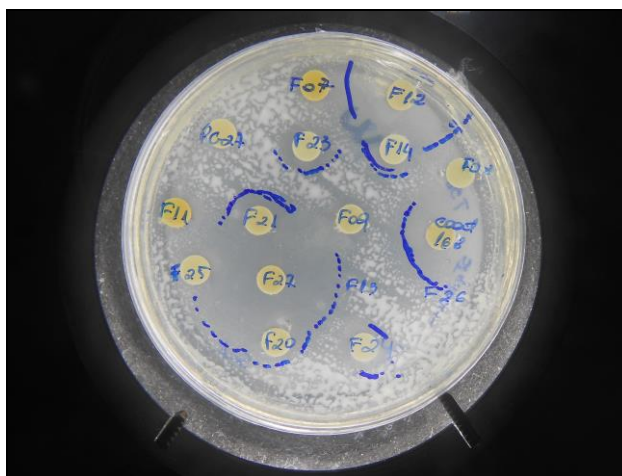


Figura 2. Ensaio antimicrobiano com extrato do isolado “Caatinga 168” contra a bactéria *S. equis*.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu concluir que o Bioma Caatinga possui grande diversidade de microrganismos, e que estes podem ser muito eficazes no controle de pragas da agricultura. A actinobactéria Caatinga 168 mostrou grande potencial de ação contra fungos fitopatogênicos e também contra microrganismos patógenos em seres humanos. Isso mostra a importância em se estudar microrganismos, principalmente os que vivem em condições extremas, como no caso da Caatinga. Portanto, ressalta-se a importância da preservação e conservação desse bioma, para que assim não sejam perdidos microrganismos com potencial para controle biológico e até mesmo com potencial farmacológico.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa de iniciação científica, e à Embrapa Meio Ambiente, por oferecer a estrutura necessária para a elaboração da pesquisa.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, W.L. et al. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Departamento de Genética- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba – ESALQ – USP. 2002. 79p. apud KAVAMURA, V.N. et al. **Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought**. *Microbiological Research*. v.168, p.183-191, 2012.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Plano de divulgação do Bioma Caatinga**. 2011.
- CRUZ, M.F.A. et al. **Aplicação foliar de produtos na redução da severidade da brusone do trigo**. *Tropical Plant Pathology*, v. 36, n.6, Brasília nov./dez. 2011.
- FILHO, R.C.; ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O. **Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophilacinus***. *Tropical Plant Pathology*, v. 33, n. 6. Brasília nov./dez. 2008.
- KAVAMURA, V.N. et al. **Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought**. *Microbiological Research*. v.168, p.183-191, 2012.
- KILIKIAN, B.V.; PESSOA Jr., A. 2001. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Pp. 493-520.
- LUCON, C.M.M.; AKAMATSU, M.A.; HARAKAVA, R. **Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n.6, Brasília, jun. 2008.
- MALAVOLTA, V.M.A. et al. **Progresso da brusone nas folhas e panículas de genótipos de arroz de terras altas**. *Summa Phytopathologica*, v. 34, n.2, Botucatu, abr./jun. 2008.
- PINTO, Z.V. et al. **Podridão das raízes causada por *Pythium aphanidermatum*, em cultivares de alface produzidas em sistema hidropônico**. *Summa Phytopatol*, v. 37, n. 4, p. 180-186, Botucatu, 2011.
- VASCONCELLOS, R.L.F. et al. **Isolamento e seleção de actinobactérias promotoras do crescimento de plantas de solo rizosférico de *Araucaria angustifolia***. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* [online]. 2010, vol. 67, n.6, pp. 743-746.