

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

PROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS DE TOMATEIRO COM
PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS E SUA OTIMIZAÇÃO

Margaroni Fialho de Oliveira
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Brasil
Dezembro, 2009

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

O48p Oliveira, Margaroni Fialho de

Prospecção de actinomicetos endofíticos de tomateiro com produção de metabólitos bioativos e sua otimização / Margaroni Fialho de Oliveira. – 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof. Sueli Teresinha van der Sand

1. Actinomicetos 2. Lycopersicon esculentum 3. Atividade antimicrobiana 4. Controle biológico I. Sand, Sueli Teresinha van der II. Título.

CDU 579.64 (043)

Agradecimentos

À Dra. Sueli T. Van Der Sand pela orientação, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e, principalmente pelo incentivo, carinho e amizade.

Ao Dr. José Carlos Germani coordenador do PPGMAA pelo incentivo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos professores do Departamento de Microbiologia pela colaboração.

Aos professores Andréa B. Moura, Valmir Duarte, Eduardo Tondo pelo fornecimento de alguns dos microrganismos empregados neste trabalho.

Ao professor Marcelo Gravina, chefe do Departamento de Fitossanidade, por proporcionar às condições necessárias para o desenvolvimento dos testes em casa de vegetação.

Às minhas amigas do coração: Sabrina Salamoni, Julie Zanin, Daniele Oliveira, Themis, Raquel Damasceno, Michele Malmann, Viviane Juliano, Aline, Mariana, pela amizade, companheirismo e infinitos momentos de descontração.

Às minhas bolsistas Evelise Bach, Mariana Germano e Paula pela amizade e auxílio muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus cumprades e, principalmente, grandes amigos Tiéle e Marcelo pelo carinho, incentivo e companheirismo.

Dedico

À minha mãe pelo seu amor incondicional e presença e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao Gustavo Vasconcellos pelo seu amor, companheirismo, apoio, incentivo e principalmente, pela sua enorme compreensão e paciência. Obrigado por compreender e aceitar os vários momentos de solidão para que este trabalho se consolidasse.

Prospecção de actinomicetos endofíticos de tomateiro com produção de metabólitos bioativos e sua otimização

Autor: Margaroni Fialho de Oliveira
Orientadora: Sueli T. Van Der Sand

RESUMO

Actinomicetos endofíticos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) têm recebido atenção especial como potenciais produtores de novos compostos bioativos e agentes de biocontrole contra fitopatógenos. Portanto, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar actinomicetos endofíticos de tomateiro que apresentem atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias de importância clínica e/ou agrônômica, selecionar o microrganismo com melhor potencial antimicrobiano, caracterizar este isolado, otimizar as condições de produção do(s) composto(s) e realizar testes *in vivo* com o potencial agente de biocontrole. Actinomicetos foram isolados das raízes desinfestadas de tomateiro e foram submetidos ao teste de antibiose pelo método de dupla camada contra 39 microrganismos de importância clínica e 16 fitopatogênicos. Todos os actinomicetos foram caracterizados em nível de gênero através de características morfológicas e moleculares. A otimização da produção foi realizada empregando AC, TSB, ISP2, Sahin, Czapeck-Dox, Bennett's e LNMS como meios de cultura e nas temperaturas de 30, 35 e 40°C. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de difusão em ágar. O teste *in vivo* foi realizado em casa de vegetação e foi avaliada a capacidade do actinomiceto proteger o tomateiro contra a murcha bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum*. Foram isolados 70 actinomicetos endofíticos, destes 55 foram do gênero *Streptomyces* sp., nove *Microbispora* sp., três *Micromonospora* sp. e três *Nocardia* sp. Dos 70 isolados, 88,6% apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um fitopatógeno e 87,1% inibiram os microrganismos clinicamente importantes. No processo de otimização da produção os isolados selecionados cresceram em todas as condições analisadas, entretanto somente apresentaram atividade em determinadas condições de cultivo. O isolado selecionado para o teste *in vivo*, R18(6), inibiu o desenvolvimento da murcha bacteriana em condições de casa de vegetação. Os actinomicetos isolados apresentaram potencial antimicrobiano.

1 Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (130p.). Dezembro de 2009.

Prospection of endophytic actinomycetes from tomato with production of metabolites bioactives and their optimizing

Author: Margaroni Fialho de Oliveira

Adviser: Sueli T. Van Der Sand

ABSTRACT

Endophytic actinomycetes from tomato plant (*Lycopersicon esculentum*) receiving special attention because of its potential have been as a source for new bioactive compounds and as biocontroler agent against phytopathogens. Therefore, the aim of this study was to isolate and characterize endophytic actinomycetes from tomato with activity against bacteria and fungi of clinica and agriculture importance; to select the isolate with the best antimicrobial activity, to characterize this isolate, to optimize the growth and production, to carry out a test *in vivo* with selected biocontrol agent. Actinomycetes were isolated from tomato roots and were submitted of antibiose test using the double-layer agar method against 39 clinical important microorganisms and 16 phytopathogens. All actinomycetes were characterized in level of genus using morphological characteristics and molecular analysis. The optimization of growth conditions and production were tested in SC, TSB, ISP2, Sahin, Czapeck-Dox, LNMS media culture and 30, 35 and 40°C temperature conditions. The antimicrobial activity was evaluated using the agar-well diffusion method. The test *in vivo* was carried out in greenhouse and the capacity of actinomyce to protect of tomato against wilt bacteria caused by *Ralstonia solanacearum* was evaluated. Seventy endophytic actinomycetes were isolated from the tomato roots. Out of these 55 were identified as *Streptomyces* sp, 9 as *Microbispora* sp., 3 as *Micromonospora* sp. and 3 as *Nocardia* sp.. Out of the 70 isolates 88.6% of the isolates inhibited at least on the tested phytopathogens and 87.1% inhibited the microorganisms with clinical importance. In the production optimization the select isolates grew in all conditions tested, however the production of the compounds was observed only in specific conditions of growth. The isolate R18(6), was select for the *in vivo* test, and in the greenhouse experiment the isolate inhibited the development of wilt bacteria in tomato plants under greenhouse conditions. The actinomycetes isolated in the work showed an excellent antimicrobial potential.

1Doctoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (130 p.) December, 2009.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2.1. Actinomicetos.....	4
2.2. Endofíticos.....	7
2.2.1. Actinomicetos endofíticos.....	8
2.3. Actinomicetos como agentes de biocontrole.....	10
2.3.1. Mecanismos empregados para biocontrole.....	13
2.4. Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>).....	16
2.5. Agrotóxicos.....	24
2.6. Microrganismo de importância clínica.....	27
2.7. Referências Bibliográficas.....	31
CAPÍTULO 1.....	39
1. Abstract.....	39
2. Resumo.....	40
3. Introduction.....	40
4. Material and Methods.....	42
4.1. Sample collection.....	42
4.2. Isolation of endophytes.....	43
4.3. Checking surface-sterilization	43
4.4. Actinomycetes characterization.....	44
4.5. Molecular classification of the isolates	44
4.6. Tested microorganisms.....	45
4.7. Antimicrobial activity.....	45
4.8. Media optimization and production	46
4.9. Antibacterial activity of the supernatant.....	47
5. Results.....	48
6. Discussion.....	51
7. Acknowledgments.....	54
8. References.....	54
CAPÍTULO 2.....	62
1. Abstract.....	67
2. Introduction.....	67
3. MATERIAL AND METHODS.....	69
3.1. Actinomycetes.....	69
3.2. Antimicrobial activity - Antibiosis.....	70
3.3. Siderophore production.....	70
3.4. Phosphate solubility.....	71
3.5. Indole acetic acid production (IAA).....	71
3.6. Optimization of production of antimicrobial compounds.....	71
3.7. Characterization of the selected isolate.....	73
3.8. DNA sequence analysis	73
4. Results.....	74
5. Discussion.....	77
6. Acknowledgments.....	82
7. References.....	83

CAPÍTULO 3.....	93
1. Resumo.....	95
2. Introdução.....	95
3. Material e métodos.....	97
3.1. Obtenção dos isolados.....	97
3.2. Colonização in vitro das raízes de tomateiro por <i>Streptomyces</i> sp. R18(6).	97
3.3. Microbiolozação das sementes.....	98
3.4. Bioensaio em casa de vegetação.....	98
3.5. Isolamento de <i>R. solanacearum</i> e de <i>Streptomyces</i> sp.R18(6) do solo e das raízes do tomateiro após o cultivo.....	100
3.6. Potencial enzimático.....	101
3.7. Testes estatísticos	102
4. Resultados.....	103
5. Discussão.....	104
6. Agradecimentos.....	108
7. Referências.....	108
DISCUSSÃO.....	114
3.1. Isolamento dos actinomicetos.....	115
3.2. Caracterização dos actinomicetos endofíticos em nível de gênero.....	118
3.3. Avaliação do potencial antimicrobiano.....	120
3.3.1. Potencial antimicrobiano contra microrganismos clinicamente importantes	120
3.3.2. Otimização das condições de produção do(s) composto(s) com atividade antimicrobiana.....	124
3.3.3. Potencial antimicrobiano contra fitopatógenos.....	126
3.3.4. Otimização das condições de produção do(s) composto(s) com atividade antifitopatogênica	130
3.4. Caracterização do isolado R18(6).....	131
3.5. Avaliação do potencial de biocontrole do <i>Streptomyces</i> R18(6)) contra <i>Ralstonia solanaceraum</i> em condições da casa de vegetação.....	133
3.6. Referências Bibliográficas.....	136

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1: Percentage of endophytic actinomycetes with antimicrobial activity against test organisms used in the assay of double layer method (n=61, only actinomycetes with activity).....58

Table 2: Number of endophytic actinomycetes with antagonistic activity against bacteria, yeast, and filamentous fungi (n=61, only actinomycetes with activity).....59

Table 3. Antibiotic activity of strains BIO3 and R3(1) in SC and ISP2 broth media. Inhibition zone (mm) (average of triplicates experiments)after different incubation time.....60

CAPÍTULO 2

Table 1: Percentage of endophytic actinomycetes with antimicrobial activity against phytopatogens bacteria and filamentous fungi in the double layer assay.....84

Table 2: Percentage of actinomycetes with antagonistic activity against phytopatogenic bacteria and fungi and percentage of isolates with positive reaction to IAA, siderophore and phosphate solubility.....85

Table 3. Inhibition haloes (mm) produced by isolate R18(6) against the phytopatogens when grown in TSB, Czapeck-Dox and Starch casein media, at temperatures of 30 and 35°C and pH 6, 7 and 8.....86

Table 4: Biochemical response of *Streptomyces* sp. R18(6) compared with those of similar *Streptomyces* species.....87

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Altura, peso fresco e número de plantas de tomateiro vivas ao final do experimento inoculadas ou não com *Ralstonia solanacearum* e tratadas ou não com *Streptomyces* sp. R(18(6), 1ª repetição.....106

Tabela 2: Altura, peso fresco e número de plantas de tomateiro vivas ao final do experimento inoculadas ou não com *Ralstonia solanacearum* e tratadas ou não com *Streptomyces* R(18(6), 2ª repetição.....107

Tabela 3: Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Streptomyces* sp. R18(6) e *R. solanacearum* no solo após o término dos experimentos.....108

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1.: PCR amplification products using primers Strep B and Strep F (1074bp). Line (1) Molecular weight Ladder 100pb; (2) Positive control: *Streptomyces viridocromogenes*; (3) Negative control: *Nocardia asteroides*; (4 - 9) isolates identified as *Streptomyces* sp.; (10 - 12) *Micromonospora* sp.; (13-15) isolated identified as *Nocardia* sp. ; (16) isolated identified as *Microbispora* sp.....61

Figure 2.: Electrophoresis on 1,5% agarose gels containing ethidium bromide to analyse fragments obtained with the enzymes HinfI, TaqI and HaeIII. (1) 100pb Ladder; (2) digestion with HinfI; (3) digestion with TaqI; (4) digestion with HaeIII; - (a) *Streptomyces* sp.; (b) *Microbispora* sp.; (c) *Micromonospora* sp.; (d) *Nocardia* sp.....62

CAPÍTULO 2

Figure 1: *Streptomyces* R18(6) scanning electron micrograph. A seven days culture on starch-casein agar. Chains of spores in spiral shape with smooth surface.88

Figure 2: Phylogenetic dendrogram obtained by neighbor-joining analysis based on 540pb. Of 16S rDNA gene sequences, showing the position of strain R18(6) among its phylogenetic neighbors. Numbers on *Streptomyces* R18(6) scanning electron micrograph. A seven days culture on starch-casein agar. Chains of spores in spiral shape with smooth surface.....89

CAPÍTULO 3

Figure 1: Representa as diferenças entre os tratamentos 1 (T1), 4 (T4) e 5 (T5), onde: T1 - Sementes imersas em caldo amido caseína / Solo sem infestação; T4 - Tratamento 4: Semente sem tratamento / Solo com *R. solanacearum* e com *Streptomyces* R18(6); T5 - Semente sem tratamento / Solo com *R. solanacearum*.....109

1.INTRODUÇÃO

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas, caracterizadas pela diversidade morfológica e produção de diferentes metabólitos secundários biologicamente ativos, tais como enzimas extracelulares, pesticidas, pigmentos, agentes antitumorais e antibióticos.

Os antibióticos produzidos por este grupo de microrganismos têm sido empregados em vários campos incluindo: agricultura, veterinária e indústria farmacêutica. A maioria dos antibióticos empregados atualmente são produzidos por actinomicetos, destacando-se entre eles o gênero *Streptomyces* sp.

A aplicação de agrotóxicos é o método mais empregado para o controle de doenças em plantas. Contudo, podem causar poluição ambiental, desequilíbrio ecológico e efeitos prejudiciais sobre uma variedade de organismos não alvo, inclusive o homem. Por esta razão, nos últimos anos houve um grande aumento no número de pesquisas com agentes de biocontrole, baseadas em microrganismos, com o objetivo substituir ou diminuir o uso dos agrotóxicos.

Neste contexto, os actinomicetos, especialmente, *Streptomyces* sp. têm sido definidos como potenciais agentes de biocontrole de doenças em plantas.

A atividade de biocontrole destes microrganismos pode envolver diferentes mecanismos, entre eles: antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência. Além disto, podem promover o crescimento de plantas através da produção e/ou indução de hormônios de crescimento e disponibilização de nutrientes.

O número de novos metabólitos secundários continua a aumentar em pesquisas farmacológicas e biológicas, indicando que espécies de *Streptomyces*, com grande potencial em biotecnologia existem na natureza. Nas duas últimas décadas foram descobertas, várias moléculas bioativas como: a alnumicina, o fitoxazolin A, B e D, antibiótico polieno (ABO23), a vinilamicina e a geldamicina, sendo que ABO23 e o fitoxazolina B e D têm demonstrado atividade antagonística contra vários fungos fitopatogênicos. Além disto, verificou-se que vários metabólitos também influenciam o crescimento e fisiologia da planta.

No que diz respeito à indústria farmacêutica, o advento de resistência a drogas observado em muitos microrganismos e o crescente aumento de infecções fúngicas torna necessária a descoberta de novos antibióticos e agentes quimioterápicos que sejam mais efetivos e menos tóxicos.

Levando-se em consideração os prejuízos que a utilização de agrotóxicos pode causar ao meio ambiente, à saúde de humanos e animais, e as vantagens que a utilização de agentes de biocontrole podem proporcionar para

controlar patógenos de plantas além da necessidade de buscar novos antibióticos, este trabalho teve como objetivos: isolar e identificar morfológica e bioquimicamente actinomicetos endofíticos de tomateiro que tenham atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias de importância clínica e agrônômica tanto para a cultura do tomateiro como para outras culturas; selecionar o melhor produtor de metabólito(s); caracterizar molecularmente este isolado; otimizar as condições de produção deste(s) metabólito(s); purificar parcialmente os metabólitos encontrados; testar o potencial de biocontrole e de promoção de crescimento do actinomiceto selecionado *in vivo* em condições de casa de vegetação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Actinomicetos

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas, com alto conteúdo de guanina e citosina no seu DNA (Monciardini et al., 2002). Eles caracterizam-se pela diversidade morfológica e produção de metabólitos secundários, como os antibióticos produzidos principalmente, no final da fase exponencial do ciclo de crescimento. Os actinomicetos também são notórios na produção de enzimas extracelulares, agentes antitumorais, antihelmínticos, antivirais, herbicidas e inseticidas.

Actinomicetos estão amplamente distribuídos na natureza e a maioria das espécies são quimiorganotróficas, aeróbias, mesofílicas e apresentam crescimento ótimo em pH próximo a neutralidade. Importantes fatores controlando a abundância e atividade dos actinomicetos no solo têm sido sugeridos, entre eles estão: abundância de matéria orgânica, conteúdo de umidade, disponibilidade de

nutrientes, salinidade, pH, temperatura e vegetação do solo (El-Tarabily et al., 2006).

Esses microrganismos são diretamente afetados pela presença de fontes de carbono disponíveis. Em geral, sítios com alto teor de carbono e húmus abrigam um número maior de microrganismos do que habitats pobres em matéria orgânica (El-Tarabily et al., 2006).

Eles não são influenciados por condições semi-áridas como são as demais bactérias, pois, são favorecidos por níveis relativamente baixos de umidade. A alta contagem em solos secos pode ser devido à acentuada esporulação dos actinomicetos nestas condições, o que pode compensar a morte dos propágulos miceliais resultando na manutenção dos altos números de unidades formadoras de colônia (El-Tarabily et al., 2006).

Os actinomicetos possuem uma grande diversidade de habitats. Podem ser isolados de humanos, animais, plantas, águas residuais, produtos alimentícios, pedras e construções, porém o seu habitat principal é o solo (Groth et al., 1999).

Segundo Kennedy (1999), os actinomicetos compreendem mais de 30% da população total de microrganismos no solo e estão adaptados para crescer sobre substratos sólidos. Os substratos insolúveis e poliméricos são fontes primárias de carbono no solo, desta forma estes microrganismos secretam uma variedade de enzimas extracelulares e produzem hifas que penetram e colonizam o substrato (McCarthy & Williams, 1992).

Os actinomicetos desempenham um papel crucial na decomposição de compostos orgânicos e poluentes ativos na natureza (Groth et al., 1999). Eles são ativos na decomposição de materiais orgânicos no solo, incluindo lignina e outros polímeros recalcitrantes e podem degradar resíduos agrícolas e urbanos (Heuer et al., 1997).

Os actinomicetos são qualitativa e quantitativamente importantes na rizosfera. Segundo Crawford et al. (1993) e Cao et al. (2004a), eles podem influenciar o crescimento de plantas e podem proteger as raízes da invasão de fungos patogênicos, podendo desta maneira, serem utilizados no controle biológico de doenças de plantas. Actinomicetos também atuam como um grupo antagonista de microrganismos colonizadores de raízes podendo desempenhar funções na colonização e formação de micorrizas, hiperparasitismo de fungos, oósporos ou escleródios de fungos, produção de compostos herbicidas e inseticidas.

Segundo Rugthaworn et al. (2007), estreptomicetos são ativos na rizosfera e os modos de ação de isolados incluem: antibiose, lise da parede celular de fungos, competição e hiperparasitismo.

Os antibióticos produzidos por este grupo de microrganismos têm sido empregados em vários campos incluindo: agricultura, veterinária e indústria farmacêutica. Aproximadamente 75% dos antibióticos, clínica e comercialmente importantes e 60% dos empregados na agricultura são produzidos por actinomicetos, destacando-se entre eles o gênero *Streptomyces* sp. (Fguira et al.,

2005; Oskay et al., 2004). Segundo Sahin & Ugur (2003), os actinomicetos produzem aminoglicosídeos, glicopeptídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, políenios e tetraciclina entre outros.

2.2. Endofíticos

Considera-se endofítico aquele microrganismo que pode ser isolado do interior da planta ou da superfície desinfectada dos seus tecidos, além disso, a planta deve estar saudável. As bactérias endofíticas isoladas de diferentes plantações compreendem mais de 129 espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas distribuídas em mais de 54 gêneros (Pullen et al., 2002; Hasegawa et al., 2006).

De acordo com Castillo et al. (2007) o relacionamento biológico entre organismos endofíticos e a planta é que a planta proporciona nutrição para o microrganismo e este proporciona alguma forma de proteção para a planta.

Endofíticos foram detectados em plantas crescendo em florestas tropicais, temperadas e boreais e em plantas herbáceas em vários habitats, incluindo ambientes extremos. Residem, principalmente, nos espaços intracelulares e tecidos vasculares internos (Zhang et al., 2006) e já foram isolados de uma ampla variedade de tecidos de plantas, tais como sementes, óvulos, frutos, caule, raízes, folhas, brotos, xilema e casca.

Endofíticos, usualmente, produzem enzimas necessárias para a colonização dos tecidos das plantas. A maioria é capaz de utilizar, no mínimo *in vitro*, componentes celulares da planta. A maioria dos endofíticos investigados

utilizam xilana, pectina, apresentam atividade lipolítica e produzem peroxidases e lacases não específicas, quitinases e glucanases (Firáková et al., 2007).

As bactérias endofíticas apresentam algumas vantagens em relação às demais. Elas não estão sujeitas à competição por nutrientes, o que normalmente ocorre no solo da rizosfera. Além disto, por estarem localizadas internamente, possuem maior eficiência, visto que os compostos bioativos por elas sintetizados encontram-se prontamente disponíveis às plantas (Mariano et al., 2004).

Segundo Tian et al. (2004), as bactérias endofíticas podem ter muitos efeitos sobre o seu hospedeiro, tais como acentuar a resistência ao estresse, insetos e doenças e melhorar a produtividade. Além disto, eles também constituem uma fonte valiosa de novos metabólitos secundários com diferentes aplicações.

2.2.1. Actinomicetos endofíticos

Os actinomicetos que residem nos tecidos de plantas saudáveis, sem causar sintomas de doença, foram definidos como actinomicetos endofíticos (Castillo et al., 2007). O primeiro actinomiceto endofítico estudado foi *Frankia* sp., isolada de plantas não leguminosas em 1886 (Hasegawa et al., 2006). Posteriormente, vários outros gêneros de actinomicetos endofíticos foram isolados de plantas entre eles: *Streptomyces* sp., *Streptovertillium* sp., *Nocardia* sp., *Micromonospora* sp., *Microbispora* sp. e *Streptosporangium* sp.

Igarashi (2004) isolou 398 actinomicetos de 24 espécies de plantas herbáceas e arbóreas, selvagens ou agrícolas, o que sugere a ampla distribuição e associação destes microrganismos com plantas no seu ambiente natural.

Sardi et al. (1992) isolaram actinomicetos endofíticos de 28 espécies de plantas obtidas de diferentes ambientes geográficos e climáticos da Itália. Neste estudo, foram isolados 499 actinomicetos, a maioria (482) *Streptomyces* sp.. Os autores isolaram actinomicetos de todas as espécies de plantas examinadas.

Os actinomicetos endofíticos são considerados agentes potenciais para o biocontrole porque podem: produzir substâncias nos tecidos das plantas, incluindo antibióticos, enzimas e sideróforos (Tian et al., 2004); não estão sujeitos à competição com bactérias do solo (Cao et al., 2004a); podem colonizar a parede de plantas (Cao et al., 2004a). Além disto, estes microrganismos produzem esporos, os quais proporcionam maior tempo de permanência no ambiente.

Novos compostos bioativos foram obtidos de actinomicetos isolados de plantas vivas, entre eles: herbicidina H, um metabólito de *Streptomyces* sp. SANK63997 isolado de folhas de *Setaria viridis* var. *Pachystachys*; sulfoximina γ -glutalmetionina isolada de *Microbispora* sp. endofítica de *Carex kobomugi*, ambos metabólitos são inibidores do crescimento de plantas, ou seja, apresentam atividade herbicida (Hasegawa et al., 2006). Fistupirona, um metabólito de *Streptomyces* sp. isolado de *Allium fistulosum*, que inibe a infecção de couve chinesa por *Alternaria brassicola*. Ácidos pterídicos que induzem a formação de raízes adventícias no feijão, foram isolados do caldo de cultura de *Streptomyces*

hygroscopicus endofítico de *Pteridium aquilinum*. 6-prenilindol isolado do caldo de cultura de *Streptomyces* sp. TP-A0595 mostrou atividade antifúngica contra os patógenos de plantas, *Alternaria brassicola* e *Fusarium oxysporum* (Igarashi, 2004).

Metabólitos antimicrobianos como dois novos análogos da novobiocina produzidos por *Streptomyces* sp. Isolados de *Aucuba japonica* e cerdamicina por *Streptomyces* sp. Endofítico de *Cryptomeria japonica*. Anicemicina, um potente agente antitumoral, produzido por *Streptomyces thermoviolaceus* isolado de *Aucuba japonica*. Cletramicina, produzido por *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0326, apresenta atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Cerdamicina A, isolada do caldo de cultura de *Streptomyces* sp. TP-A0456 isolado de *Cryptomeria japonica*, apresentou atividade antifúngica contra *Candida glabrata* (Igarashi, 2004). Estes resultados indicam que as plantas são fontes potenciais de isolamento de microrganismos produtores de novas moléculas bioativas.

2.3. Actinomicetos como agentes de biocontrole

Os actinomicetos são reconhecidos pelo seu potencial para controle biológico de plantas. Na China, *Streptomyces* sp. tem sido usado por mais de 30 anos para proteger as lavouras de algodão contra patógenos. Além disso, Kemira Oy desenvolveu o biofungicida Mycostop, que contém células vivas de *Streptomyces griseoviridis* (Valois et al., 1996). Mycostop é um biofungicida

baseado no *Streptomyces griseoviridis* K61 isolado da turfa *Sphagnum* sp.. Este produto comercial pode controlar ou suprimir algumas doenças da podridão das raízes ou murcha, causadas por *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. e *Phytophthora* sp., se colonizar a rizosfera antes do patógeno (Minuto et al., 2006). Inoculante comercial Nutrillife é disponível como grânulos, contendo 20 isolados bacterianos, entre eles *Streptomyces albidoflavus* e *Streptomyces cellulosa* (Conn & Franco, 2004).

Os actinomicetos endofíticos são considerados uma fonte nova de metabólitos bioativos e têm sido isolados de vários hospedeiros tais como: tomate, banana, trigo e milho como promissora atividade antimicrobiana contra isolados patogênicos (Verma et al., 2009).

Dentre os actinomicetos, o gênero *Streptomyces* sp. recebe destaque por ser responsável pela maioria dos antibióticos conhecidos. O número de novos metabólitos secundários continua a aumentar em pesquisas farmacológicas e biológicas, indicando que espécies de *Streptomyces* sp., com grande potencial biotecnológico existem na natureza (Reis et al., 2003). Nas duas últimas décadas foi descoberta, por exemplo, a alnumicina, o fitoxazolin A, B e D, antibióticos polieno (ABO23), a vinilamicina e a geldamicina. O antibiótico ABO23 e o fitoxazolin B e D têm demonstrado atividade antagônica contra vários fungos fitopatogênicos (Shimizu et al., 2000).

Pandhare & Deshpande (2002) verificaram a produção de inibidores de protease alcalina por *Streptomyces* sp.. Este fato é bastante importante, pois estas

proteínas são essenciais para o ciclo de vida de muitos organismos fitopatogênicos. Desta forma, os actinomicetos inibidores de proteases apresentam um grande potencial no uso de biocontrole em plantas.

Castillo et al. (2002) isolaram a munumbicina, um antibiótico de amplo espectro isolado de *Streptomyces* sp. NRRL 30562, endofítico de *Kennedia nigricans*. O composto foi capaz de inibir completamente o crescimento de *Pythium ultimum* em placas de BDA.

Minuto et al. (2006) verificaram que *Streptomyces* sp. isolado da rizosfera de tomate suprimem o tombamento de transplantes de tomate causado por *Rhizoctonia solani* em condições de casa de vegetação.

Estudos realizados por Yuan & Crawford (1995) demonstraram que *Streptomyces lydicus* possui forte antagonismo contra vários fungos patogênicos. Este antagonismo pode dar-se através da produção de metabólitos antifúngicos extracelulares e de seus esporos ou micélio. Nestes estudos, os autores verificaram que todos os fungos patogênicos de raízes testados, foram moderadamente ou muito sensíveis aos metabólitos antifúngicos liberados pelo *S. lydicus* no ágar. Este microrganismo causou morte local ou no mínimo prolongou a inibição do crescimento de *P. ultimum* e *Aphanomyces euteiches*. Esta espécie de actinomiceto também demonstrou capacidade para parasitar hifas de *Fusarium solani*.

2.3.1. Mecanismos empregados para biocontrole

Vários mecanismos de controle de fitopatógenos têm sido observados entre os actinomicetos endofíticos, dentre eles podemos citar os seguintes exemplos:

a) Hiperparasitismo: o micélio do patógeno pode ser parasitado pelo antagonista na sua fase ativa no solo ou na planta, enquanto os oósporos podem ser parasitados pelo antagonista na fase de sobrevivência do patógeno (El-Tarabily et al., 2006).

Já foi relatado que zoósporos de *Actinoplanes* sp. apresentam respostas quimiotáticas à presença de conídios, clamidósporos e escleródios de fungos. Na presença das hifas de *Pythium coloratum*, os zoósporos de *Actinoplanes philippinensis* nadam em direção à hifa, alojam-se sobre a superfície da mesma e continuam a germinar e penetrar o micélio (El-Tarabily et al., 2006).

Micromonospora globosa parasitou hifas de *Fusarium udum* *in vitro*. A interação com as hifas incluiu: enrolamento, penetração, ramificação da hifa crescente do hiperparasita dentro do fungo hospedeiro levando à granulação, coagulação do citoplasma e lise da hifa (El-Tarabily et al., 2006).

b) Enzimas degradadoras da parede celular: há registros de supressão de *Sclerotinia minor* por *Micromonospora carbonacea*. Este antagonista produz altos níveis de quitinase e β -1,3-glucanase e quando o patógeno vivo é apresentado como única fonte de carbono, o antagonista causa plasmólise das hifas, lise da parede celular e reduz significativamente os níveis de incidência da

doença sob condições controladas de casa de vegetação (El-Tarabily et al., 2006). *M. carbonacea* pode controlar o ataque de *Phytophthora cinnamomi* sobre *Banksia grandis* pela produção de celulase e β -glicosidase, causando lise das hifas e redução da severidade da podridão da raiz sob condições controladas em casa de vegetação (El-Tarabily et al., 2006).

c) Antibióticos: extratos de *Streptomyces* sp. isolados de *A. fistulosum* apresentaram potencial para suprimir *A. brassicola* sobre sementes de couve chinesa. Dois novos análogos da novobiocina foram produzidos por *Streptomyces* sp. isolados de *A. japonica*. Cedarmicina, metabólito antimicrobiano, foi produzido por *Streptomyces* sp. isolados de *C. japonica*. Alnumicina, um novo antibiótico naftoquinona, foi produzido por *Streptomyces* sp. isolado de nódulos de raízes de *Alnus glutinosa*. Coronamicina, complexo antibiótico peptídeo, foi isolado de *Streptomyces* sp. MSU-2110 isolado de *Monstera* sp. (Hasegawa et al., 2006).

d) Indução de resistência na planta hospedeira: *Streptomyces* sp. R-5 induziu a resistência ativando os genes de defesa associados com o jasmonato e síntese de fitolexina. A resistência das sementes tratadas com R-5 pode ter sido ocasionada pelo complexo mecanismo que inclui antibiose e resistência sistêmica associada com a produção de jasmonato e fitoalexina pelas sementes (Hasegawa et al., 2006).

e) Produção de sideróforos: fator importante para o antagonismo contra fitopatógenos e também para o crescimento da planta. Os sideróforos exibem considerável variabilidade estrutural e afinidade por ferro, o que determina o

crescimento do microrganismo sob condições competitivas quando a disponibilidade deste composto é um fator limitante (Cao et al., 2005). Competição por ferro é considerada como um possível mecanismo para o controle de fitopatógenos. *Streptomyces* sp. tem sido reportado por produzir sideróforo tipo hydroxamato que pode inibir o crescimento de fitopatógenos por competição por ferro nos solos da rizosfera (Khamna et al., 2009).

Os actinomicetos endofíticos também desempenham papel importante como promotores de crescimento de plantas. Esta capacidade está relacionada com a produção de fitormônios e compostos afins e também disponibilização de nutrientes. Desta forma, ácidos pterídicos A e B, promotores de crescimento com atividade semelhante à auxina, foram isolados do caldo de fermentação de *S. hygrosopicus* TP-A-045 isolado de *P. aquilinum*. Estes compostos aceleram a formação de raízes adventícias em hipocólito de feijão (Igarashi, 2004). Várias espécies de estreptomicetos, incluindo *S. violaceus*, *S. scabies*, *S. griseus*, *S. exfoliates*, *S. coelicolor* e *S. lividans* foram reportados por secretar ácido indol acético (AIA) quando o meio de cultura contém triptofano, entretanto a sua produção dentro dos tecidos da planta não foi provada (Hasegawa et al., 2006; Igarashi, 2004).

A solubilização de fosfato por microrganismos é outro aspecto que auxilia o desenvolvimento da planta, visto que este elemento é essencial para o crescimento desta e para a produção agrícola. Muitos solos são deficientes em fósforo disponível para o crescimento da planta, visto que a maioria do fósforo

presente nos solos está na forma de metais quelados inorgânicos. Desta forma, microrganismos solubilizadores de fosfato empregam diferentes estratégias para solubilização, isto inclui acidificação, quelação de íons e troca iônica. Hamdali et al. (2008) observaram que *Micromonospora aurantica* e *S. griseus* foram capazes de tornar o fósforo, naturalmente presente no solo, disponível para a planta, o que acarretou no aumento do peso seco dos brotos e das raízes de trigo. Estes microrganismos também foram capazes de reduzir significativamente a severidade do tombamento causado por *P. ultimum*.

2.4. Tomateiro (*Lycopersicon esculentum*)

O tomateiro, *Lycopersicon esculentum*, é uma planta dicotiledônea, pertencente à família Solanaceae. O tomateiro cultivado é uma planta herbácea, anual, de caule redondo, piloso e macio, quando jovem, que se torna anguloso e fibroso com o passar do tempo. As sementes são pequenas e possuem pêlos curtos. Os frutos são carnosos, podem ter dois ou mais lóculos, podem ser vermelhos, amarelos ou cor-de-rosa, dependendo da variedade (Minami & Haag, 1979).

Conforme o seu hábito de crescimento, o tomate pode ser dividido em “estaqueado” (de mesa) ou “rasteiro” (industrial). No estaqueado, as plantas apresentam porte maior e necessitam de suporte para o crescimento dependendo do uso intensivo de mão-de-obra, é o preferido para o consumo “in natura”. No

cultivo rasteiro, as cultivares são de porte baixo e não necessitam de suporte, sendo mais utilizado para a indústria (Latorraca et al., 2008).

O tomateiro representa uma das mais expressivas culturas no cenário agrícola mundial, sendo que na América Latina, o Brasil destaca-se como o maior produtor (Töfoli et al., 2003). Segundo dados da FAO, o Brasil situa-se entre os dez maiores produtores mundiais de tomate, a safra de 2007 ficou em torno de 3.431.230 toneladas, plantadas numa área de 58.404 hectares.

A cultura do tomate é atacada por inúmeros fitopatógenos, mais de 200 já foram descritos (Filho et al., 2008). Dentre as doenças provocadas por fitopatógenos podemos citar:

a) Pinta-preta → causada pelo fungo *Alternaria solani*, caracteriza-se pela presença de pintas pardo-escuras, arredondadas, formadas por anéis concêntricos, envolvidas por um halo amarelado. Pode afetar as folhas, as hastes e os frutos (EMBRAPA, 2007). Porém, no Brasil a doença parece manifestar ampla adaptação climática, ocorrendo em todas as estações. Possivelmente, é a doença fúngica da folhagem do tomateiro de mais difícil controle por meio de pulverizações com fungicidas (Figueira, 1982). Segundo Blume e Jara (2004), pinta-preta é a moléstia fúngica mais importante para o tomateiro no Brasil.

b) Podridão do esclerócio → causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii*, caracteriza-se por uma podridão mole e aquosa nas folhas, hastes e frutos que ficam em contato direto com o solo (EMBRAPA, 2007). Principal sintoma é a

murcha da planta provocada pela destruição do tecido da base do caule. Doença associada à alta temperatura e alta umidade (Lopes & Santos, 1994).

c) Mela-de-rizoctonia → causada pelo fungo *Rhizoctonia solani*. As folhas e as hastes infestadas apresentam podridão mole e aquosa, enquanto que os frutos apresentam podridão marrom, mole e aquosa, coberta por um mofo micelial marrom-claro (EMBRAPA, 2007).

d) Murcha-de-fusário → causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Caracteriza-se pelo amarelecimento forte, tipo "gema de ovo", nas folhas mais velhas, progredindo para as mais novas, Os folíolos amarelos murcham e secam, mas as folhas ficam presas ao caule. Os vasos lenhosos das folhas e do caule ficam com coloração parda e aparência seca, os frutos geralmente não se desenvolvem, podendo ocorrer queda prematura e descoloração dos vasos (EMBRAPA, 2007).

e) Podridão do colo e da raiz → causada pelo fungo *Fusarium oxysporum*. Quando acarretada por esta doença, as folhas do tomateiro ficam amareladas, depois murcham e podem morrer em decorrência da necrose da região do colo e das raízes (EMBRAPA, 2007).

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*. é um importante patógeno do solo com potencial para limitar a produtividade do tomate em casas de vegetação e em plantações. Perdas na produção foram relatadas variando entre 20 e 60%. A disseminação do patógeno é difícil de prevenir porque os microconídios são transportados pelo vento e o patógeno pode ser transmitido na ausência de

sintomas. Controle químico, utilizando brometo de metila, proporciona bom controle, no entanto o seu uso foi proibido na Europa a partir janeiro de 2005, devido aos prejuízos ocasionados à camada de ozônio. Muitos agentes de biocontrole, avaliados contra podridão do colo e da raiz, não proporcionaram controle que fosse suficiente, quando aplicados sozinhos. O uso de agentes de biocontrole em conjunto com fungicidas pode ser uma estratégia complementar para controlar as doenças ocasionadas por este patógeno. Isto pode ter um benefício adicional, que é redução das doses de fungicidas o que ocasiona redução de resíduos e impacto ambiental (Omar et al., 2006).

f) Podridão-de-esclerotínia → ocasionada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. As partes da planta mais próximas ao solo ficam apodrecidas e, sob alta umidade aparece um micélio branco nas partes infectadas. À medida que a doença se desenvolve, o caule fica seco e adquire uma coloração de palha. Os frutos atacados desenvolvem uma podridão mole. Possui elevada capacidade destrutiva e alta persistência no solo através de estruturas de resistência (Lopes & Santos, 1994).

g) Talo-oco ou podridão mole dos frutos → esta doença é causada principalmente, pelas bactérias *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* e por *Erwinia chrysanthemi*. As bactérias requerem temperatura e umidade elevadas para se tornarem problemas e penetram no tomateiro através de ferimentos (EMBRAPA, 2007).

h) Cancro-bacteriano → doença provocada pela bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Tomateiros que sofrem colonização sistêmica apresentam murcha total ou unilateral das folhas mais velhas, queima dos bordos dos folíolos e descoloração vascular. É comum ocorrer intensa queda de frutos, os quais podem apresentar escurecimento vascular do pedúnculo (Lopes & Santos, 1994).

i) Murcha-bacteriana → é causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*. Os sintomas são caracterizados pela perda da turgidez dos tecidos foliares, começando pelos ramos mais novos e atingindo toda planta, causando a morte desta, em casos esporádicos, ocorre amarelecimento das folhas (Lima, 2003). A bactéria invade o sistema vascular da planta através de ferimentos ou aberturas naturais, progride através dos espaços intercelulares no xilema, coloniza os ramos resultando na coloração marrom do xilema, epinastia foliar e murcha generalizada. Pode ocasionar perda total das plantações de tomate (Dannom & Wydra, 2004).

A murcha bacteriana do tomateiro está associada a solos encharcados e temperaturas altas, sendo mais problemática no verão e em regiões de clima quente. O alto teor de água no solo favorece a infecção inicial e acelera o movimento da bactéria no interior dos vasos do tomateiro. A murcha é mais severa após períodos de alta precipitação. Entretanto, evidências indicam que a doença pode se desenvolver em solos mais secos, desde que a umidade permaneça relativamente constante (Marouelli et al., 2005).

Ralstonia solanacearum é uma bactéria altamente diversa e adaptativa, que difere em variedade de hospedeiros, distribuição geográfica, patogenicidade, interações epidemiológicas e propriedades fisiológicas. Baseando-se na variedade de hospedeiros pode ser dividida em raças, enquanto que a caracterização fisiológica e genética resulta na formação de biovars e divisões. Controle desta bactéria é difícil, devido à ampla variedade de hospedeiros e capacidade de sobrevivência em vários ambientes tais como água de irrigação e solo (Dannon & Wydra, 2004).

Segundo Netto et al. (2004) as perdas, no Amazonas, das plantações de tomate da variedade Santa Cruz, suscetível à *R. solanacearum*, podem ser totais. Em áreas recentemente desmatadas, cultivadas pela primeira vez com solanáceas observaram-se perdas de até 40% das plantas. Plantas daninhas infectadas por *R. solanacearum* podem servir de reservatório do patógeno contribuindo para a manutenção da população da bactéria no solo. O autor também detectou a presença das biovars N2, 1 e 3 e observou que a biovar N2 possui elevada virulência em tomateiros, porém menor sobrevivência no solo do que os biovars 1 e 3.

Em Taiwan, a incidência da murcha nas plantações de tomate pode variar entre 15 e 55% e as perdas econômicas podem chegar a 12 milhões de dólares, anualmente. Neste país foi verificada a presença das raças 1 e 3. Observou-se que a raça 3 apresentava uma variedade de hospedeiros mais restrita do que a raça 1 (Thierry & Wang, 1999).

A maioria destes patógenos, além de provocar doenças no tomateiro, também pode causar danos a outras culturas. Segundo Cao et al.(2004b), *R. solani* é um dos mais importantes fungos patogênicos, podendo se desenvolver em solos cultivados e não cultivados, causando doenças em diversas culturas, incluindo o arroz (Tian et al., 2004). *F. oxysporum* pode ocasionar doença conhecida como mal do Panamá, que é uma das doenças mais importantes da banana e que se caracteriza pelo definhamento desta cultura (Cao et al., 2004a) podendo também atacar o trigo ocasionando o seu enfraquecimento (Taechowisan et al., 2005 e Taechowisan et al., 2003). *R. solanacearum* é uma das mais importantes bactérias do solo, podendo causar a murcha bacteriana em mais de 200 espécies de plantas, incluindo batata, tomate, ervilha, tabaco, banana, etc (Tan et al., 2006).

A suscetibilidade do tomate a diversos fitopatógenos faz com que inúmeras doses de agrotóxicos sejam aplicadas nesta cultura. Segundo trabalhadores a frequência da aplicação de agrotóxicos na cultura do tomate ocorre, em média, a cada três dias. Contudo, dependendo da época do ano pode ser realizado diariamente (Alves et al., 2008). A média nacional de agrotóxicos, no tomateiro, é de aproximadamente, 40 Kg/ha por safra (Veiga & Silva, 2005). Como consequência, os frutos tornam-se impróprios para o consumo devido à presença de resíduos de agrotóxicos nos mesmos.

Segundo dados da ANVISA (2009), das 104 amostras de tomate analisadas, 18,27% foram considerados insatisfatórias para o consumo, devido à

presença de resíduos de agrotóxicos, (fentoato e permetrina), acima do limite máximo, como também pela presença de resíduos de agrotóxicos não autorizados para esta cultura (aldicarbe, aletrina, clorpirifós, clorpirifós metílico, metamidofós, ciproconazol e folpete). Além disto, foi detectada a presença de aldicarbe, o inseticida mais tóxico conhecido para mamíferos. Em outro estudo foi observado que 17% das amostras do tomate para a produção industrial encontravam-se impróprias para consumo em virtude dos altos níveis de metamidofós encontrados; enquanto que no tomate de mesa foi constatado que 58,6% das amostras de tomate encontravam-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, com respeito a resíduos tóxicos, com valores acima do permitido para o inseticida organofosforado metamidofós e a presença ilegal do organoclorado endosulfan (Conceição, 2003).

Estudos têm revelado que microrganismos podem atuar eficientemente como agentes de biocontrole de doenças do tomateiro e também como promotores de crescimento. Cao et al. (2004b) verificaram que *Streptomyces* sp. endofíticos protegem as sementes de tomateiro contra *R. solani* e promovem um aumento na germinação das sementes.

Nocardioides thermophilacinus isolada da rizosfera de tomateiro quando dispensada no filoplano de plantas de tomateiro, cultivado em casa de vegetação, reduziu a severidade das lesões ocasionadas por fungos e bactérias (Filho et al., 2008).

Streptomyces pulcher controlou em 100% a incidência do cancro-bacteriano e da murcha bacteriana do tomate ocasionados, respectivamente, por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *R. solanacearum* (El-Abyad et al., 1993).

O bioproduto EXTN-1, baseado no *Bacillus vallismortis*, reduziu a intensidade de doenças causadas por *R. solanacearum*, *F. oxysporum* e *Phytophthora capsici* (Thanh et al., 2009).

A utilização dos isolados Tr76 e Tr30 de *Trichoderma harzianum* controlaram, respectivamente, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici*. O primeiro isolado controlou a doença durante todo ciclo da cultura. O segundo proporcionou proteção às plantas de tomate contra septoriose até um período aproximado de 110 dias, reduzindo em até 70% a aplicação de fungicidas químicos (Valim-Labres, 2001).

2.5. Agrotóxicos

No Brasil, a lei federal número 7.802 de 11 de julho de 1989, no seu artigo 2º, inciso I, define agrotóxicos como produtos e componentes de processos físicos, químicos e biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados

nocivos. Inclui também substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimulantes e inibidores de crescimento (Brasil, 1989).

Os agrotóxicos são divididos em quatro classes toxicológicas: I - extremamente tóxico; II – altamente tóxico; III – mediantemente tóxico; IV – pouco ou muito pouco tóxico. No Brasil existem cerca de 300 princípios ativos em duas mil formulações comerciais diferentes, classificados quanto à sua ação e ao grupo químico ao qual pertencem (Stoppelli & Magalhães, 2005).

No Brasil o consumo de agrotóxicos no período de 1970-1980 aumentou de 27.728 toneladas para 80.968 toneladas (Zavati & Abakerli, 1999). No período entre 1991 e 2000, observou-se um aumento de quase 400% no consumo desses agentes químicos frente a um aumento de 7,5% na área plantada. O Brasil atua no mercado dos agrotóxicos como um dos principais consumidores do mundo e o maior da América do Sul. Seu consumo é estimado em torno de 6,5 bilhões de dólares/ano (Peres & Moreira, 2007).

Segundo Conceição (2003) o grau de eficiência dos agrotóxicos diminui à medida que o número de aplicações aumenta. Isso porque, ao fazer uso dos agrotóxicos, o agricultor além de erradicar as pragas, também elimina seus inimigos naturais, ou seja, seus predadores e competidores. Indivíduos resistentes são selecionados e como a competição por alimento, espaço e abrigo é menor termina ocorrendo aumentos substanciais na população, fazendo com que a praga volte mais resistente e em níveis populacionais maiores do que antes da aplicação.

Os agrotóxicos figuram atualmente como um dos principais poluidores e agentes causadores de impacto nos agrossistemas, podendo ocasionar degradação dos recursos naturais fundamentais para a fertilidade do solo, alterações em sua estruturação, ciclagem de nutrientes e, principalmente, na diminuição da diversidade. Desta forma, mudanças na composição ou atividade da comunidade microbiana podem acarretar efeitos imediatos e permanentes no funcionamento do ecossistema (Conceição, 2003).

Aproximadamente 20% de todos os agrotóxicos conhecidos são suspeitos de serem carcinogênicos. Além desses efeitos adversos, os agrotóxicos podem ser teratogênicos e mutagênicos, podendo afetar o sistema imunológico (Conceição, 2003). Eles podem ser absorvidos via dérmica, inspirado pelos pulmões ou ingeridos em produtos contaminados. Seus efeitos adversos à saúde dependem das suas características químicas, da quantidade absorvida ou ingerida, do tempo de exposição e das condições gerais de saúde da pessoa contaminada (Veiga, 2007). A Organização Mundial da Saúde estima que ocorram no mundo cerca de três milhões de intoxicações agudas por agrotóxicos anualmente, provocando cerca de 220 mil mortes (Veiga et al., 2006).

O Grupo de Estudos Epidemiológicos em Toxicologia formado pelos centros de Belo Horizonte, Campinas, Florianópolis, Londrina, Maringá e Ribeirão Preto, relatou que os pesticidas foram responsáveis por 46,9% das mortes nos seis Hospitais Universitários do Brasil no período de 1994-1996, dentre os 53.921 casos de intoxicação relatados no campo (Conceição, 2003).

2.6. Microrganismo de importância clínica

A partir da descoberta da actinomicina em 1940 e da estreptomicina, a primeira droga realmente efetiva para o tratamento da tuberculose, em 1943, os actinomicetos tornaram-se famosos como produtores de antibióticos e outros metabólitos secundários com atividade biológica.

A maioria dos antibióticos empregados atualmente foi isolada de actinomicetos provenientes do solo. Entretanto, actinomicetos endofíticos tem-se mostrado promissores como produtores de antibióticos. Antibióticos de amplo espectro (munumbicinas) são produzidos por *Streptomyces* sp. NRRL30562, um endofítico de *K. nigriscans*. Estes antibióticos demonstram atividade contra bactérias Gram-positivas, tais como *Bacillus anthracis* e *Mycobacterium tuberculosis* multiresistente a drogas. Munumbicina D, também é ativa contra *Plasmodium falciparum*. *Streptomyces* sp. NRRL30566 endofítico de *Grevillea pteridifolia* produz kakadumicina. Kakadumicina A apresenta amplo espectro, especialmente entre bactérias Gram-positivas, também inibe *P. falciparum*. (Strobel & Daisy, 2003). Coronamicinas, um complexo de peptídeos novos, foi isolado de *Streptomyces* sp. endofíticos de *Monstera* sp. e desempenha atividade bioativa contra *Cryptococcus neoformans* e *P. falciparum* (Zhang et al., 2006).

Ação sinérgica de metabólitos secundários tem sido observada em *Streptomyces* sp.. Combinações de antibióticos β -lactâmicos e inibidores da β -lactamase são conhecidos por serem efetivos contra bactérias resistentes a β -

lactâmicos. *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces jumonjinensis* e *Streptomyces katsurahamanus* todos produzem ácido clavulâmico e também produzem cefamicina C (um β -lactâmico). *Streptomyces graminofaciens* e *Streptomyces loidensis* têm sido relatados por co-produzir estreptogramina tipo A e B. Estreptogramina A ou B sozinha tem efeito bacteriostático e juntas têm efeito bacteriocida (Challis & Hopwood, 2003).

Entretanto, apesar do grande número de compostos com atividade antimicrobiana existentes, a necessidade de descobrir novos antibióticos faz-se necessária devido à crescente aquisição de resistência por microrganismos patogênicos.

Nos Estados Unidos a pneumonia atinge mais de quatro milhões de pessoas por ano, sendo *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, as espécies mais frequentemente isoladas. Trinta e quatro por cento do *S. pneumoniae*, 32% do *H. influenzae* são resistentes à ampicilina e 91,5% da *M. catarrhalis* são resistentes à penicilina e 15% à eritromicina (Kitouni et al., 2005).

Pseudomonas aeruginosa pode causar infecções nosocomiais graves, com elevada letalidade. Atualmente, se posiciona entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares, perdendo apenas para o *Staphylococcus aureus*. *P. aeruginosa* vem apresentando diminuição da sensibilidade aos antibióticos de maior espectro como os carbapenêmicos e as cefalosporinas. O aumento da resistência deve-se à produção de beta-lactamases e metalo-beta-

lactamases. Outra característica preocupante é a resistência cruzada aos antimicrobianos que resulta da coexistência de vários mecanismos de resistência num único hospedeiro. Estudo realizado em dois hospitais de Pernambuco revelou alta prevalência de multiresistência, com 49,7% das cepas resistentes a três ou mais antibióticos e 28% das cepas resistentes a seis antibióticos ou mais (Figueiredo et al., 2007).

Pseudomonas aeruginosa é responsável pela maioria das infecções nosocomiais. Este microrganismo é capaz de metabolizar uma ampla variedade de compostos para obter energia. O microrganismo também adquire resistência a antibióticos e desinfetantes comumente usados nos hospitais, dificultando o processo de sanitização do hospital e os esquemas de tratamento da maioria destas infecções (Saadoun et al., 2008).

A ocorrência de *S. aureus* resistente à meticilina passou de menos de 3% no início de 1980 para mais de 40% em 2003. Opções terapêuticas para infecções causadas por *Staphylococcus* sp. coagulase-negativa resistentes à meticilina e à oxacilina são limitadas à vancomicina. Entretanto, terapia com vancomicina tem sido associada com resposta lenta e inadequada, em muitos casos. Desta forma a necessidade para descobrir e desenvolver antibióticos novos e efetivos é uma prioridade (Sahim & Ugur, 2003).

Staphylococcus sp. coagulase negativa tem a capacidade de produzir glicocálice o que os capacita a ligarem-se a materiais prostéticos. Formação de biofilme sobre a superfície de aparelhos médicos proporciona um ambiente

protegido para o estafilococo, a formação de biofilme impede a penetração do antibiótico e reduz a formação do sítio alvo. Estes microrganismos são usualmente resistentes à meticilina (Lentino et al., 2008).

Enterococcus sp. tornaram-se o segundo organismo mais comum recuperado de infecções nosocomiais de ferimentos e trato urinário e a terceira causa mais comum de bacteremia nosocomial nos Estados Unidos. Uma das principais razões para que este microrganismo sobreviva no ambiente hospitalar é a sua resistência intrínseca a vários antibióticos, e talvez o mais importante seja a sua habilidade para adquirir resistência a todos antibióticos atualmente disponíveis, através de mutação ou por receber material genético através da transferência de plasmídios e transposons. A resistência a altas concentrações aminoglicosídeos é usualmente mediada por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, as quais são amplamente distribuídas entre os *Enterococcus* sp.. Muitos isolados de *Enterococcus faecium* são altamente resistentes a penicilinas porque as proteínas ligadoras de penicilina têm baixa afinidade pelas penicilinas (Cetinkaya et al., 2000).

Cetinkaya et al (2000) observaram que vários pacientes hospitalizados portadores de enterococci resistentes à vancomicina no Reino Unido tinham pouco ou nenhum contato com instituições médicas. Investigações posteriores revelaram que vários destes pacientes residiam em fazendas e que frangos e suínos eram colonizados com *E. faecium* resistentes à vancomicina (VRE). A ocorrência de VRE pode estar relacionada com o fato de avoparcina (um glicopeptídeo) estar

disponível como aditivo de ração. Sugere-se que produtos alimentares contaminados servem como reservatório dos quais indivíduos não hospitalizados podem adquirir VRE. Microrganismos VRE podem permanecer viáveis sobre a superfície ambiental e equipamentos médicos por dias ou semanas, visto que estes microrganismos são resistentes à dissecação e a temperaturas extremas.

Em relação às infecções fúngicas, além dos problemas relacionados com a resistência a compostos antifúngicos ainda há, o relacionado com a toxidez apresentada pela maioria destes compostos. Segundo Gupte et al (2002) a anfotericina B aplicada no tratamento de infecções causadas por *Blastomyces* sp., *Candida* sp., *Cryptococcus* sp. e *Histoplasma* sp. causa nefrotoxicidade, redução do fluxo de sangue renal, náuseas, vômito e anorexia. Nistatina, aplicada para candidíase também é tóxica no uso sistêmico e griseofulvina causa hepatotoxicidade e dores abdominais.

2.7. Referências Bibliográficas

ALVES, S.M.F.; FERNADES, P.M.; MARIN, J.O.B. Condições de trabalho associadas ao uso de agrotóxicos na cultura do tomate de mesa em Goiás. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, p.1737-1742, 2008.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/resultados_PARA_2008.pdf>. Acesso em 08 jun. 2009.

BLUME, E.; JARA, A.S.A. Moléstias em tomateiro cultivado em estufas plásticas em quatro municípios da região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p.661-666, 2004.

BRASIL. Lei Federal número 7.802 de 11 de julho de 1989, artigo 2º, inciso I. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/LEIS/L7802.htm>>. Acesso em: 21 nov. 2009.

CAO, L. et al. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.247, n.2, p.147-152, 2005.

CAO, L. et al. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.20, n.5, p.501-504, 2004a.

CAO, L. et al. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v.39, p.425-430, 2004b.

CASTILLO, U.F. Et al. Biologically active endophytic streptomycetes from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia. **Microbial Ecology**, New York, v.53, p.12-19, 2007.

CASTILLO, U.F. et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, Spencers Wood, v.148, p.2675-2685, 2002.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant Enterococci. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v.13, n.4, p.686-707, 2000.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.100, sup.2, p.14555-14561, 2003.

CONCEIÇÃO, M.H. Riscos dos agroquímicos para a saúde humana. **Universitas Ciências da Saúde**, Brasília, v.1, n.1, p.97-103, 2003.

CONN, V.M.; FRANCO, C.M.M. Effect of microbial inoculants on the indigenous actinobacterial endophyte population in the roots of wheat as determined by terminal restriction fragment length polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.11, p.6407-6413, 2004.

CRAWFORD, D. et al. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.11, p.3899-3905, 1993.

DANNON, E.A.; WYDRA, K. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.64, n.65, p.233-243, 2004.

EL-ABYAD, M.S. et al. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant Soil**, Dordrech, v.149, n.2, p.185-195, 1993.

EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.38, n.7, p.1505-1520, 2006.

EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/tomate/tomateindustrial>>. Acesso em: 20 jun. 2007.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Disponível em: <<http://WWW.fao.org>>. Acesso em: 12 nov. 2009.

FIGUEIRA, F.A.R. **Manual de Olericultura: Cultura e Comercialização de Hortaliças**. Vol. II. São Paulo. Agronômica Ceres Ltda. 1982. p.223-292.

FIGUEIREDO, E.A.P. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v.19, n.4, p.421-427, 2007.

FGUIRA, L.F. et al. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. Strain US80. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.156, n.3, p.341-34, 2005.

FILHO, R.C.; ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O. Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophiliscinus*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, n.6, p.457-460, 2008.

FIRÁKOVÁ, S.; STURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVA, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, Bratislava, v.62, n.3, p.251-257, 2007.

GROTH, I. et al. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.36, p.115-122, 1999.

GUPTA, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B.N. Antifungal antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v.58, n.1, p.46-57, 2002.

HAMDALI, H. et al. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.40, n.3, p.510-517, 2008.

HASEGAWA, S. et al. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. **Actinomycetologia**, Tokyo, v.20, n.2, p.72-81, 2006.

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.8, p.3233-3241, 1997.

IGARASHI, Y. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. **Actinomycetologia**, Tokyo, v.18, p.63-66, 2004.

KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; LUMYONG, S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.25, p.649-655, 2009.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, 1999, v.74, n.1-3, p. 65-76.

KITOUNI, M. et al. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. **Journal Mycologie Médicale**, Paris, v.15, n.1, p.45-51, 2005.

LATORRACA, A. et al. Agrotóxicos utilizados na produção do tomate em Goiânia e Goianópolis e efeitos na saúde humana. **Comunicação em Ciências da Saúde**, Brasília, v.19, n.4, p.365-374, 2008.

LENTINO, J.R.; NARITA, M.; YU, V.L. New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positiva cocci. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, Dordrecht, v.27, n.1, p.3-15, 2008.

LIMA, J.L. **Seleção de actinomicetos para o controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e promoção de crescimento de mudas de tomateiro**. 2003. 72f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2003.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília, EMBRAPA, 1994, 61p.

MARIANO, R.L.R. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v.1, p.89-111, 2004.

MARQUELLI, W.A.; LOPES, C.A.; SILVA, W.L.C. Incidência de murcha bacteriana em tomate para processamento industrial sob irrigação por gotejamento e aspersão. **Horticultura Brasileira**, Brasília v.23, n.2, p.320-323, 2005

MCCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environmental – a review. **Gene**, Amsterdam, v.115, p.189-192, 1992.

MINAMI, K.; HAAG, H.P. **O Tomateiro**. Campinas. Fundação Cargil. 1979. p.352.

MINUTO, A. et al. Control of soilborne pathogens to tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. **Crop Protection**, Oxford, v.25, n.5, p.468-475, 2006.

MONCIARDINI, P. et al. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. **FEMS Microbiol Ecology**, Amsterdam, v.43, n.3, p.419-429, 2002.

NETTO, R.A.C. et al. Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.1, p. 21-27, 2004.

OMAR, I.; NEILL, T.M.O.; ROSSALI, S. Biological control of fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. **Plant Pathology**, Oxford, v.55, n.1, p.92-99, 2006.

OSKAY, M.; TAMER, A.U.; AZERI, C. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. **African Journal of Biotechnology**, Washington, v.3, n.9, p.441-446, 2004.

PANDHARE, J.; ZOG, K.; DESHPANDE, V.V. Differential stabilities of alkaline protease inhibitors from actinomycetes: effect of various additives on thermostability. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.84, n.2, p.165-169, 2002.

PERES, F.; MOREIRA, J.C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, sup.4, p.5612-5621, 2007.

PULLEN, C. et al. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of *Celastraceae*. **Planta**, Berlin, v. 216, n.1, p.162-167, 2002.

REIS, S.A. et al. Protein synthesis inhibitory activity in culture filtrates from new strains of *Streptomyces* isolated from Brazilian tropical soils. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v.37, n.2, p.138-143, 2003.

RUGTHAWORN, P. et al. A search and improvement of actinomycete strains for biological control of plant pathogens. **Kasetsart Journal: Natural Science**, Bangkok, v. 41, n.5, p.248-254, 2007.

SAADOUN, I. et al. Recovery of soil streptomycetes from arid habitats in Jordan and their potential to inhibit multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.24, n.2, p.157-162, 2008.

SAHIN, N.; UGUR, A. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v.27, n.2, p.79-84, 2002.

SARDI, P. et al. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.8, p.2691-2693, 1992.

SHIMIZU, M. et al. Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolatad from Rhododredron and its antifungal activity. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.66, n.4, p.360-366, 2000.

STOPPELLI, I.M.B.; MAGALHÃES, C.P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.10, p.91-100, 2005.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.67, n.4, p.491-502, 2003.

TAECHOWISAN, T. et al. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology**, Spencers Wood, v.151, p.1691-1695, 2005.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.19, n.4, p.381-385, 2003.

TAN, H.M.; CAO, E.L.; HE, E.Z.F. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* *in vitro*. **World Journal of Microbiology & biotechnology**, Oxford, v.22, n.12, p.1275-1280, 2006.

THANH, D.T. et al. Biological control of soilborne diseases on tomato, potato and black pepper by selected PGPR in the greenhouse and field in Vietnam. **Plant Pathology Journal**, Bari, v.25, n.3, p.263-269, 2009.

THIERRY, X.J.; WANG, J. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Race 1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology**, Sant Paul, v.89, n.4, p.320-327, 1999.

TIAN, X.L. et al. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.20, n.3, p.303-309, 2004.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; GARCIA Jr, O. Controle da requeima do tomateiro com fungicidas e seus reflexos na produção. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.4, p.473-482, 2003.

VALIM-LABRES, M.E. **Controle biológico de *Septoria Lycopersici* e de outros fungos patogênicos à cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) por *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride***. 2001. 104f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2001.

VALOIS, D. et al. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.5, p.1630-1635, 1996.

VEIGA, M.M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.12, n.1, p.145-152, 2007.

VEIGA, M.M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil, **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22, n.11, p.2391-2399, 2006.

VEIGA, M.M.; SILVA, D.M. Análise da contaminação por agrotóxicos em sistemas hídricos superficiais e subterrâneos no município de Paty do Alferes, RJ. In: **23º**

Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, VII-049, 2005, Campo Grande, p.1-5, 2005.

VERMA, V.C. et al. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, diversity, and anti-microbial activity. **Microbiological Ecology**, New York, v.57, n.4, p.749-756, 2009.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**, Cambridge, v.23, p.753-771, 2006.

ZAVATTI, L.M.S.; ABAKERLI, R.B. Resíduos de agrotóxicos em frutos de tomate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.3, p.473-480, 1999.

YUAN, W.M., CRAWFORD, D.L. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYE108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.6, n.8, p.3119-3128, 1995.

CAPÍTULO 1

Screening for endophytic actinomycetes from tomato root showing antimicrobial activity¹

¹ Artigo submetido ao Comitê Editorial do Periódico Científico Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Screening for endophytic actinomycetes from tomato root showing antimicrobial activity

1. Abstract

Seventy endophytic actinomycetes were successfully isolated from surface-sterilized tomato roots. These isolates were characterized by morphological and molecular methods and assessed for their activity against bacteria, yeasts, and filamentous fungi. The group of isolates with gray mycelia was the most abundant. Of all the endophytic actinomycete isolates, 87.1% produced bioactive metabolites, and of these, 32.8% were active against bacteria, yeasts, and filamentous fungi. Two isolates showed a wide spectrum of activity, inhibiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Salmonella enteritidis*. In culture media optimization it was observed that the strains have grown in all broth media tested but the antimicrobial metabolite(s) were not produced in all media and growth conditions. Further study is now required to identify these compounds and to determine whether any of them are novel.

Key words: antibacterial and antifungal activity

2. Resumo

Setenta actinomicetos endofíticos foram isolados da superfície desinfestada das raízes de tomateiro. Estes isolados foram caracterizados através de análises morfológicas e moleculares e foram avaliados quanto a atividade contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Os *Streptomyces* sp. com micélio aéreo cinza foram os mais abundantes. Dentre os actinomicetos endofíticos isolados 87.1% produziram metabólitos bioativos, e destes, 32.79% foram ativos contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Dois isolados apresentaram amplo espectro de ação, inibindo inclusive *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *Salmonella enteritidis*. Nos meios de cultura empregados para o otimização observou-se que os isolados selecionados cresceram em todos os meios testados, entretanto os metabólitos com atividade antimicrobiana só foram produzidos nos meios SC e ISP2 e nas temperaturas de 30 e 35°C. Estudos adicionais são requeridos para caracterizar os metabólitos antimicrobianos produzidos.

Palavras chaves: atividade antibacteriana e antifúngica.

3. Introduction

Actinomycetes are Gram-positive bacteria, with a high content of guanine (G) plus cytosine (C) in their DNA¹. They are metabolically diverse, and are able to use different sources of carbon. They are among the most widely distributed group of microorganisms in nature, found abundantly in fertile and unfertile, cultivated or uncultivated soils in many regions throughout the world. Their role in the future of biotechnology will be significant, because of their importance as producers of secondary metabolites including antibiotics, antitumor agents, immunomodifying agents, and antiviral agents, among others².

Approximately 4000 antibiotics derived from bacteria and fungi have been discovered. Many of these compounds have found applications in human and veterinary medicine, and agriculture; most of them are produced by *Streptomyces* sp.³. However, the advent of drug resistance in most bacterial pathogens and the current increase in the number of fungal infections have increased interest in finding other reserves of biologically bioactive compounds from microorganisms.

According to Luzzaro et al.⁴, the proportion of bloodstream infections caused by oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus epidermidis* in Europe is 34 and 70%, respectively. Nosocomial infections caused by *Candida* sp. increased 500% in the 1980s, along with an increased in resistance to antifungal compounds.

There is there for a general call for new antibiotics, chemotherapeutic agents, and agrochemicals that are highly effective, and have low toxicity and

minimal environmental impact. One important biological niche that has been overlooked is the endophytic actinomycetes, a potential source of new natural products to be applied in medicine, agriculture, and industry. There are approximately 300,000 plant species on earth, and each plant is a host for one or more endophytic microorganisms⁵.

Endophytic actinomycetes have been isolated from stems and roots from many plants^{6, 7, 8}. Several genera of actinomycetes have been isolated from different plant species, e.g., *Nocardia* sp., *Micromonospora* sp., *Microbispora* sp., *Streptosporangio* sp., and especially *Streptomyces* sp.⁶. These actinomycetes have yielded different bioactive products, which show antibacterial and antifungal activity, and also antitumor and antiviral agents^{8, 9}. Another feature that makes endophytic actinomycetes attractive for the isolation of bioactive products is the possibility that they are not toxic to eukaryotic cells. If this is so, problems associated with toxicity would be much diminished¹⁰.

In this context of the search for new antibiotics, the aim of the present study was to screen endophytic actinomycetes from tomato roots looking for isolates with activity against bacteria and fungi. The tomato plant was chosen for this study because it is a very susceptible culture to many diseases caused by different phytopathogens which are commonly controlled by various chemical products. All the actinomycetes isolated in this study will be tested against several phytopathogens, in searching of isolates that show activity against them and might be useful in biological control of diseases of the tomato plant.

4. Material and Methods

4.1. Sample collection

Endophytic actinomycetes were isolated from asymptomatic tomato roots. The root samples were collected from three sites in Canoas, Novo Hamburgo, and Nova Petrópolis, in southern Brazil. The samples were dug out carefully from each site to ensure that the roots were not damaged.

4.2. Isolation of endophytes

Samples were surface-sterilized as described by Cao et al. (3) with some modifications. Samples were washed in running water to remove soil particles, and then immersed in a solution of 70% (v/v) ethanol for 5 min, after that in 2.5% NaClO for 10 min. Finally, they were rinsed three times with sterilized distilled water. Each root sample was cut into fragments of 1 cm-long sections, and five sections were placed in Petri dishes containing different media: starch–casein agar (SCA) medium (10.0g starch, 0.3 g casein, 2.0 g K_2HPO_4 , 2.0 g NaCl, 2.0 g KNO_3 , 0.05 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$, 15.0 g agar) , S medium (3) and ISP2 agar (25). The plates were incubated at 30°C, 37°C, and room temperature for 30 days.

4.3. Checking surface-sterilization

Two experiments were carried out to validate the root-surface sterilization procedure: i) An aliquot of 100 μ L of the last rinse water used in the root treatment was transferred onto plates with SCA, S and ISP2 media. The plates were incubated at 30°C and 37°C for two weeks to check for microbial growth; ii) 10 isolates that grew on the media (SCA, S, ISP2) were submerged in 70% ethanol for five minutes and in a 2.5% sodium-hypochlorite solution for 10 min, then inoculated on SCA, ISP2, and S media and incubated under the same conditions as before; the actinomycete validity was recorded¹². Three plates were used for each medium in each experiment.

4.4. Actinomycetes characterization

Strains were characterized morphologically following the directions given by the International *Streptomyces* Project (ISP) (25). The morphology of aerial hyphae, substrate mycelia and spore chains was determined, by direct light microscopic examination, of cultures grown on SCA and ISP2 media after 7 to 10 days of incubation at 37°C. The color of the aerial spore mass of colonies and color of the substrate mycelium was determined according to Williams et al. (30). Based on this analysis isolates were grouped in separate color series.

4.5. Molecular classification of the isolates

In order to confirm the morphological characterization of the isolates, genomic DNA was extracted and three pairs of primers were used to amplify the 16S rRNA fragment. The first pair of primers F243 and R513¹⁴ was used to confirm the order Actinomycetales. The amplification conditions used were as described by the authors¹⁴. The second amplification was done using a pair of primers designed by Rintala et al.¹⁵ (StrepB 5' ACAAGCCCTGGAAACGGGGT 3' and StrepF 5'ACGTGTGCAGCCCAAGACA 3') specific for the genus *Streptomyces*. The PCR were carried out following the conditions described by Rintala et al.¹⁶. The third pair of primers used in the PCR reaction were designed by Edwards et al.¹⁷, pA (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') and pF (5'AGGAGGTGATCCAGCCGCAC'3). The mixture contained 1 pmol of each primer, 0.75 µl (100 mM) dNTPs mix, 2.5 µl of reaction buffer, 0.75 µl of 50 mM MgCl₂, 1 U Taq polymerase, 200 ng/ µl BSA (bovine serum albumin), 30 ng of DNA, and H₂O. The final working volume was 25 µl. The reaction took place with a 10 min denaturation at 94°C; 35 cycles performed as : 1 min at 94°C, 1min at 54°C, and 1 min at 72°C. These cycles were followed by a final elongation period for 10 min at 72°C. PCR product (1021 pb) was digested for 3 h with the restriction enzymes *Hinf*I, *Hae*III and *Taq*I. Samples were electrophoresed on 1,5% agarose gels containing ethidium bromide.

4.6. Tested microorganisms

The tested microorganisms used for the antimicrobial screening tests included 19 Gram-positive bacteria and 12 Gram-negative bacteria, five yeasts, and three filamentous fungi (Table 1).

4.7. Antimicrobial activity

Antimicrobial activities of the isolates were determined using the double-layer agar method. Actinomycetes were inoculated using the spotted method, onto plates with SCA medium and incubated at 30°C for 14 days. Each plate was inoculated with six different actinomycetes. Bacteria and yeast strains to be tested were grown on trypticasein soy broth (TSB) until the concentration of 10^9 cells/mL was reached. One milliliter (1 mL) of the bacteria culture was mixed with 9 mL of Mueller Hinton agar and poured over the layer with grown actinomycetes onto plates. The procedure was repeated with yeasts and 1 mL of yeast culture was mixed with 9 mL of Sabouraud agar and poured onto the plates. Plates were incubated for 24-48 h at 37°C and 28°C for bacteria and yeasts, respectively.

The filamentous fungi were grown on plates with Sabouraud agar and incubated at 28°C for 10 days. After growth, 2 mL of Sabouraud broth was laid over the colonies, and spores were dispersed. One aliquot of the spore suspension were transferred into 10 mL of Sabouraud broth and dilutions were prepared until the concentration of 10^6 spores/mL was obtained. One milliliter of the suspension was added to 9 mL of Sabouraud agar and poured onto the plates with grown

actinomycetes. The plates were incubated at 30°C for 7 days. After the incubation period, the inhibition activity was observed by the presence of haloes around the actinomycetes in all plates. All tests were repeated two times.

4.8. Media optimization and production

Two of the endophytic actinomycetes with a wide spectrum of activity in the preliminary screening were chosen, at this moment, for further studies. Different media such as SC broth, ISP2, Sahin medium¹⁸ and mineral-salts low nutrients-LNMS¹⁹ were used as the base to determine the optimal nutritional and cultural conditions for the growth and production of antimicrobial compound(s). Different cultural conditions like incubation temperatures (30, 35 and 40°C), and incubation time were studied. The fermentation media (50 mL in 250 mL Erlenmeyer flask) were inoculated with 10% (v/v) of a preculture after 48 h of growth of each isolate. The flasks were incubated at 30, 35 and 40°C for 10 days under standard conditions of aeration and agitation (150 rpm). The biosynthetic activity of isolates was followed by testing the antibiotic activity every 48 h during the fermentation. The procedure used was to collect 1 mL of the culture and centrifuge at 13000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to a new microcentrifuge tube, and used for assessment of the antimicrobial activity by the agar-well diffusion method against test microorganisms.

4.9. Antibacterial Activity of the supernatant

For the evaluation of the antimicrobial activity of the supernatant, the test organisms used were *Escherichia coli* LT⁺, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans*. By using of a sterile cork borer, wells were punctured in plates containing Muller-Hinton agar previously seeded with one of the test organisms. One aliquot (100 μ L) of supernatant of each isolate was added in each well. The Petri dishes were incubated at 8-10°C for 16 h for the diffusion of the bioactive compound. After that, the incubation took place at 37°C for 24 h. After incubation, inhibition zones were observed. Assays were carried out in triplicate.

5. Results

Rinse water from the surface-sterilized root samples showed no microbial growth on SCA, ISP2, or S agar media after 14 days of incubation at 30°C, 37°C, and room temperature. Likewise, the 10 representative isolates submitted to the same sterilization protocol failed to grow on the same three media and incubation conditions as the sterilized roots.

A total of 70 endophytic actinomycetes strains were isolated from the tomato roots. Out of these 55 were identified as *Streptomyces* sp., nine as *Microbispora* sp., three as *Micromonospora* sp., and three as *Nocardia* sp. The isolates were classified in four groups according to the color of their mature sporulated aerial mycelia. *Streptomyces* strains with a gray or yellow mycelium

were the most frequent among the endophytic isolates comprising 44.3% and 27.1% of the isolates respectively.

The amplification products obtained with the primers F243 and R513 showed a fragment profile of 302bp for all the isolates (results not shown), confirming the typical morphological characteristics of actinomycetes colonies observed in the culture media. Furthermore, when primers StrepB and StrepF were used the amplification product of 1074 bp, expected for this amplification, was observed only with the 55 isolates that were previously identified, by morphological tests, as belonging to the genus *Streptomyces* (Figure 1).

The amplification obtained with the primers A e F, after digestion with the *HinfI*, *HaeIII* and *TaqI* enzymes permitted to differentiate among *Streptomyces* sp. *Microbispora* sp. and *Nocardia* sp. and confirmed the results obtained through of the morphological characteristics. The isolates of the genus *Micromonospora* no amplified with these primers. The isolates characterized as *Streptomyces* sp. presented two, five and two fragments when digered with *HinfI*, *HaeIII* and *TaqI*, respectively. *Nocardia* sp. presented two, five and two fragments. *Microbispora* sp. presented three and four fragments when digested with *HinfI* e *HaeIII*, but don't digested with *TaqI* enzyme(Figure 2).

All 70 endophytic actinomycete strains were tested for their antimicrobial activity. Of these, 61 isolates (87.1%) inhibited the growth of at least one test microorganism. Of these 20 (32.8%) isolates were active against bacteria, yeasts, and filamentous fungi (Table 2). The distribution of actinomycetes with

antimicrobial activity, based on morphological characteristics, showed that the group of *Streptomyces* with a gray aerial mycelium contained 42.6% of the antagonistic isolates. *Streptomyces* isolates with a yellow aerial mycelium showed the widest spectrum of inhibition: 61.5% of these isolates inhibited bacteria, yeasts, and filamentous fungi (Table 2).

Of the strains with antimicrobial activity, 51 (83.6%) were active against bacterial strains. Of these 37 (72.6%) inhibited Gram positive bacteria, four (7.8%) isolates showed activity only against Gram-negative bacteria, and 10 (19.6%) produced metabolites with antagonistic activity against both Gram-positive and Gram-negative strains (Table 1).

The Gram positive bacteria most susceptible to the metabolites produced by the actinomycetes were the strains *B. subtilis* ATCC 19659 and *Paenebacillus alvei*, inhibited by 25 (35.7%) and 17 (24.3%) of the endophytic strains respectively (Table 1). On the other hand, none of the 70 endophytic actinomycetes tested showed antagonistic activity against *Enterococcus hirae*. Of the Gram-negative strains, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 was the most susceptible to the metabolites produced by actinomycetes (Table 1).

Yeasts were inhibited by 36 (59.0%) actinomycetes isolates. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* were the strains most susceptible strains. Filamentous fungi were inhibited by 32 (52.5%) of the endophytic actinomycetes. *Penicillium thomii* and *Penicillium verruculosum* were the most susceptible strains among the fungi (Table 1).

The two isolates, BIO3 and R3(1), were able to grow in all broth media tested and temperatures conditions. However, they were unable to produce antibacterial metabolites when grown in LMNS and Sahin medium and also at the incubation temperature of 40°C. Maximum antimicrobial activity was obtained at an incubation time of 120 h and isolate BIO3 showed the highest inhibition activity against the test microorganisms when grown in SC medium and the strain R3(1) when grown at ISP2 medium (Table 3). The strains were able to inhibit the Gram positive bacteria tested but they did not inhibited *E. coli* and *C. albicans*. The yeast inhibition was only obtained when the isolates were grown on solid medium.

6. Discussion

The result for the effectiveness of the surface sterilization protocol indicated that epiphytic actinomycetes could not grow after surface sterilization, so any subsequent actinomycetes isolates were in fact endophytes. The morphological and culture characterization of the isolates showed some diversity with isolates from different genera and species. Most of the endophytic actinomycetes were identified as *Streptomyces* spp. by morphological characteristics that were consistent with the results of endophytic actinomycetes from other workers^{6, 20, 21}. Isolates with gray and yellow aerial mycelia were the most active microorganisms found in this study.

The results obtained with DNA amplification using the primers StrepB-StrepF, indicated that most of the endophytic actinomycetes isolated were *Streptomyces* sp., confirming the specificity of the primers for this genus^{15, 16}.

The digestion with the *TaqI* e *Hinfi* enzymes confirmed the results obtained with the analysis of the morfological characteristics of the isolates. Each genus apresented a standarum characteristic of bands.

A higher percentage of the endophytic actinomycetes were active against Gram-positive bacteria than against the other test organisms. Similar results have been reported by different workers. Oskay et al.³ isolated 34% of active actinomycetes of which 16% were active against Gram-positive bacteria, 6% inhibited Gram-negative bacteria, and 12% were active against both. Sahin & Ugur¹⁸ observed that 45.9% of the actinomycetes isolated showed antibacterial activity, but only 5.9% inhibited the growth of Gram-negative bacteria. Although only a small percentage of isolates tested in this study showed antagonistic activity against Gram negative bacteria the results obtained in this work are promising because the important pathogens *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. and *Salmonella* sp. were inhibited. These microorganisms are progressively showing more resistance to antimicrobials such as the third generation of cephalosporin, quinolones and carbapenem²².

A strain of *B. subtilis* was the test organism that proved to be most susceptible to the metabolites produced by the endophytic actinomycetes. Similar

results were obtained by Pandey et al.²³ and Nedialkova & Naidenova²⁴ with actinomycetes isolated from Khumbu soil and Antártida respectively.

Some of the endophytic actinomycetes isolated showed a wide spectrum of activity, inhibiting bacteria, yeast and filamentous fungi. Since these microorganisms have been isolated from tomato root in the Southern region of Brazil, still a little-explored area there is a good chance that some of these isolates will produce novel metabolites.

Endophytic actinomycetes show promise for the discovery of novel antibiotics with pharmacological and agricultural applications. In the last few years, several new antibiotics with activity against the malarial parasite, phytopathogenic microorganisms, and some human-pathogenic bacteria and protozoa agents have been discovered^{8, 25}.

In this study, few of the isolates showed a wide spectrum of action, inhibiting 70-81% of the bacteria tested, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, the yeasts and filamentous fungi tested. Sacramento et al.²⁶ working with a *Streptomyces* isolated from tropical-forest soil in Brazil, observed that one strain was active against bacteria, yeast, fungi and virus. These actinomycete isolates are a promising producer of bioactive metabolites.

Some of the isolates that showed a narrower spectrum of inhibition are also very good and promising actinomycete isolates, because they were able to inhibit important clinical pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp. and *Salmonella* sp.. *P. aeruginosa* has been showing reduced

sensitivity to carbapenem and cephalosporin, and increasing resistance to multiple drugs²⁷. *Enterococcus* sp. are considered very important pathogens because of their intrinsic resistance to many antimicrobial agents and their facility in acquiring resistance from other microorganisms which makes it difficult to treat diseases caused by this bacteria²⁸. *Salmonella* sp., has been reported to produce β -lactamases with broader spectra (ESBLs)²².

The strains BIO3 and R3(1) showed good antimicrobial activity in SC and ISP2, respectively, when grown at 30 and 35°C, but no activity was observed when grown in LNMS and Sahin medium and at temperature of 40°C. The results indicated the dependence of the production of antimicrobial compound(s) on medium constituents and temperature. It has been reported that the environmental factors like temperature and incubation have influence on antibiotic production^{29, 30}. In fact, it has been shown that the nature of carbon and nitrogen sources strongly affect antibiotic production in different organisms.

The results obtained in this screening study indicate that many of the isolates have biotechnological potential for further study in optimization, production, and characterization of antimicrobial metabolites. Further studies are now required to identify these compounds and to determine if any are novel.

7. Acknowledgments

We are grateful to Coordenação e Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES/PROF) for the financial support for this work and scholarship for the student.

8. References

1. Goodfellow M, Williams E. Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 1983; 37:189-216.
2. Saadoun I, Gharaibeh R. The *Streptomyces* flora of Jordan and its' potential as a source of antibiotics active against antibiotic resistant Gram-negative bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2002;18:465-470.
3. Oskay M, Tamer AU, Azeri C. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African J Biotechnol* 2004; 3:441-446.
4. Luzzaro F, Viganò EF, Fossati D, Grossi A, Sala A, Sturla C, et al. Prevalence and drug susceptibility of pathogens causing bloodstream infections in northern Italy: a two-year study in 16 hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:849-855.
5. Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:491-502.
6. Cao L, Qiu Z, You J, Tan H. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett Appl Microbiol* 2004;39:425-430.
7. Cao, L.; Qiu, Z.; You, J.; Tan, H.; Zhou, S. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol Lett* 2005;247:147-152.

8. Castillo U, Harper JK, Strobel GA, Alesi KF, Lin J, Hunter M, et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. FEMS Microbiol Lett 2003; 224:183-190.
9. Fiaráková S, Sturdíková M, Múcková M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. Biologia 2007; 62:251-257.
10. Castillo UF, Browne L, Strobel G, Hess WM, Ezra S, Pacheco G, et al. Biologically active endophytic streptomycetes from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia. Microbial Ecol 2006;53:12-19.
11. Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Bacteriol 1966;16:313-340.
12. Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust HJ. Endophytes from herbaceous and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. Mycol Res 1993;97:1447-1450.
13. Williams ST, Goodfellow M, Wellington MH, Vickers JC, Alderson G, Sneath PHA, et al. A probability matrix for identification of some Streptomycetes. J Gen Microbiol 1983;129:1815-1830.
14. Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl Environ Microbiol 1997; 63:3233-3241.

15. Rintala H, Nevalainen A, Rönkä E. PCR primers targeting the 16S rDNA gene for specific detection of streptomycetes. *Mol Cell Probes* 2001;15:337-347.
16. Rintala H, Hyvärinen A, Paulin L, Nevalainen A. Detection of streptomycetes in house dust – comparison of culture and PCR methods. *Indoor air* 2004;14:112-119.
17. Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes, characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 7843-7853.
18. Sahin N, Ugur A. Investigation of the Antimicrobial Activity of some *Streptomyces* Isolates. *Turk J Biol* 2003;27:79-84.
19. Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM, Ousley MA. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:3899-3905.
20. Tan HM, Cao LX, He ZF, Su GJ, Be L, Zhou SN. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum in vitro*. *World J Microbiol Biotechnol* 2006;22:1275–1280.
21. Tian XL, Cao LX, Tan HM, Zeng QG, Jia YY, Han WQ, et al. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro. *World J Microbiol Biotechnol* 2004;20:303–309.

22. Peterson DL. Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Medic* 2006;119:520-528.
23. Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP. Available from: www.aehms.org/pdf/Pandey%20f.pdf 2006.
24. Nedialkova D, Naidenova M. Screening the Antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. *J Cult Collect* 2005;4:29-35.
25. Pullen C, Schmitz P, Meurer K, Bamberg DD, Lohmann S, De Castro França S, et al. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of *Celastraceae*. *Planta* 2002;216:162-167.
26. Sacramento DR, Coelho RRR, Wigg MD, de Toledo Luna Linhares LF, Matos dos Santos MG, Azevedo Soares Semedo LT, et al. Antimicrobial and antiviral activities of actinomycetes (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical Forest soil. *World J. Microbiol. Biotechnol* 2004;20:225-229.
27. Figueiredo EAP, Ramos H, Maciel MAV, Vilar MCM, Loureiro NG, Pereira RG. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. *Rev Bras Ter Intensiva* 2007;19:421-427.
28. Simonsen GS, Smabrekke LS, Monnet DL, Sorensen TL, Moller JK, Kristinsson KG, et al. Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:323-331.

29. Bernan VS, Montenegro DA, Korshalla JD, Maiese WM, Steinberg DA, Greenstein M. Bioxalomycins new antibiotics produced by the marine *Streptomyces* spp. LL-31F508: taxonomy and fermentation. J Antibiot 1994;47:1417-24.
30. Ouhdouch Y, Barakate M, Finance C. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. Eur J Soil Biol 2001;37:69–74.

Table 1: Percentage of endophytic actinomycetes with antimicrobial activity against test organisms used in the assay of double layer method (n=61, only actinomycetes with activity).

Tested microorganisms	Isolates (%)	Tested microorganisms	Isolates (%)
Gram-positive bacterias		Gram-negative bacterias	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33019	13.11	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	3.3
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 7953	24.6	<i>Escherichia coli</i> rough*	3.3
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	26.2	<i>E. coli</i> LT+ **	8.2
<i>B. subtilis</i> **	22.9	<i>Klebsiella. pneumoniae</i> ATCC 4352	9.8
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659	41.0	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	3.3
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	3.3	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	1.6
<i>E. faecium</i> **	4.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15422	1.6
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	0	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3.3
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	4.9	<i>Salmonella cholerasius</i> ATCC 13076	6.6
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1644	13.1	<i>S. cholerasius</i> ATCC 14028	1.6
<i>L.monocytogenes</i> **	3.3	<i>S. typhimurium</i> SE 86*	3.3
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	9.8		
<i>Paenebacillus alvei</i> ATCC 6344	27.9	Yeasts	
<i>P. polymyxa</i> ATCC 842	14.8	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	19.7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6.6	<i>C. albicans</i> ATCC90028	26.2
<i>S. aureus</i> INCQS 00387	13.1	<i>C. glabata</i> CBS 2001	27.9
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 33591	4.9	<i>C. tropicalis</i> CBS 84	31.2
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 17153	9.8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50.8
<i>S. pyogenes</i> ATCC 8668	14.8		
		Filamentous fungi	
		<i>Penicillium thomii</i> ATCC 1107	42.6
		<i>P. verruculosum</i> ATCC10513	42.6
		<i>Trichophyton mentagophytes</i>	21.3

*Sample from the Microbiology Laboratory of the Institute of Food Science and Technology – ICTA/ UFRGS, Brazil; ATCC- American Type Culture Collection; INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; ** Samples from our laboratory collection

Table 2: Number of endophytic actinomycetes with antagonistic activity against bacteria, yeast, and filamentous fungi (n=61, only actinomycetes with activity).

Genera/mycelium color	B	Y	F	B+F	B+Y	F+Y	B+Y+F	Total
<i>Streptomyces</i> /gray	8	2	1	3	5	2	5	26
<i>Streptomyces</i> /white	0	1	0	1	0	0	1	3
<i>Streptomyces</i> /yellow	0	0	1	1	0	2	12	16
<i>Streptomyces</i> /browm	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Nocardia</i> /white	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Nocardia</i> /yellow	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>Micromonospora</i>	2	0	0	0	0	0	1	3
<i>Microbispora</i> /gray	1	0	0	0	2	0	0	3
<i>Microbispora</i> /white	1	1	0	0	1	0	1	4
<i>Microbispora</i> /yellow	2	0	0	0	0	0	0	2

B: bacteria Y: Yeast F: Fungi

Table 3. Antibiotic activity of strains BIO3 and R3(1) in SC and ISP2 broth media. Inhibition zone (mm) (average of triplicates experiments) after different incubation time.

Strain BIO3												
Tested strains	<i>S. pyogenes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. pyogenes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>	
Temperature (°C)	30		30		30		35		35		35	
Time (h)	Medium											
	SC	ISP2	SC	ISP2	SC	ISP2	SC	ISP2	SC	ISP2	SC	ISP2
0h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96h	14	0	15	0	20	0	14	0	15	0	14	0
144h	23	0	15	0	28	28	23	0	15	0	24	0
192h	23	0	10	0	27	28	23	0	10	0	24	0
240h	24	0	10	0	28	27	24	0	10	0	22	0

Strain R3(1)												
Test strains	<i>S. pyogenes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. pyogenes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>	
Temperature (°C)	30		30		30		35		35		35	
Time (h)	Medium											
	SC	ISP2	SC	ISP2	SC	ISP2	SC	ISP2	SC	ISP2	SC	ISP2
0h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	0	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
96h	10	29	0	18	25	20	0	15	0	0	0	10
144h	12	30	18	24	24	28	0	18	0	15	0	20
192h	10	30	18	26	0	30	0	18	0	20	0	18
240h	10	29	10	24	0	28	0	17	0	18	0	18

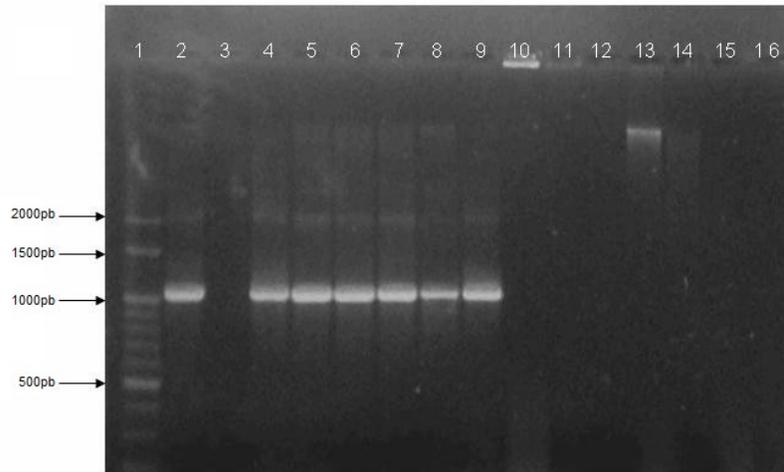


Figure 1.: PCR amplification products using primers Strep B and Strep F (1074bp). Line (1) Molecular weight Ladder 100pb; (2) Positive control: *Streptomyces viridocromogenes*; (3) Negative control: *Nocardia asteroides*; (4 - 9) isolates identified as *Streptomyces* sp.; (10 - 12) *Micromonospora* sp.; (13-15) isolated identified as *Nocardia* sp.; (16) isolated identified as *Microbispora* sp.

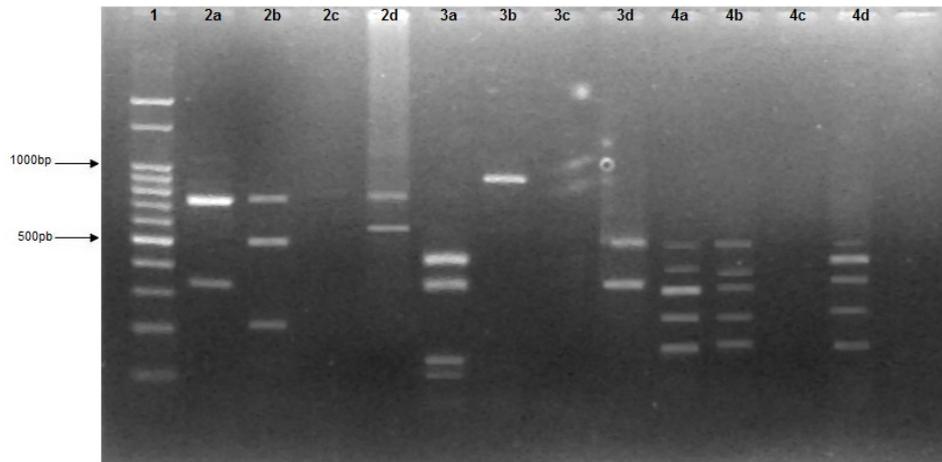


Figure 2: Electrophoresis on 1,5% agarose gels containing ethidium bromide to analyse fragments obtained with the enzymes *HinfI*, *TaqI* and *HaeIII*. (1) 100bp Ladder; (2) digestion with *HinfI*; (3) digestion with *TaqI*; (4) digestion with *HaeIII*; – (a) *Streptomyces* sp., (b) *Microbispora* sp., (c) *Micromonospora* sp.; (d) *Nocardia* sp.

CAPÍTULO 2

Anti-phytopathogen potential of endophytic actinomycetes isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent

**Anti-phytopathogen potential of endophytic actinomycetes
isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil,
and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent**

1. Abstract

Tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) are highly susceptible to phytopathogen attack. The resulting intensive application of pesticides on tomato crops can affect the environment and the health of humans and animals. The objective of this study was to select potential biocontrol agents among actinomycetes from tomato plants, in a search for an alternative phytopathogen control. We evaluated 70 endophytic actinomycetes isolated from tomato plants in southern Brazil, testing their antimicrobial activity, siderophore production, indoleacetic acid production, and phosphate solubility. The actinomycete isolate with the highest antimicrobial potential was selected using the agar-well diffusion method, in order to optimize the conditions for the production of compounds with antimicrobial activity. For this study six growth media (starch-casein-SC, ISP2, Bennett's, Sahin, Czapek-Dox, and TSB), three temperatures (25°C, 30°C, and 35°C), and different pH were tested. Of the actinomycetes tested, 88.6% showed antimicrobial activity against at least one phytopathogen, 72.1% showed a positive reaction for indoleacetic acid production, 86.8% produced siderophores, and 16.2% showed a positive reaction for phosphate solubility. The isolate R18(6) was selected due to its antagonistic activity against all phytopathogenic microorganisms tested in this study. The best conditions for production were observed in the SC medium, at 30°C and pH 7.0. The isolate R18(6) showed close biochemical and genetic similarity to *Streptomyces pluricologrescens*

Keywords: endophytic actinomycetes, biocontrol agents, phytopathogens, tomato plant

2. Introduction

Agrochemical treatments may result in environmental impacts, and pose a threat to humans and animals. As a result, there has been an increase in research on potential biocontrol agents, aiming toward a definite solution or, at

least, toward the reduction of pesticide usage in the treatment of phytopathogenic diseases.

Actinomycetes have been considered as potential biocontrol agents of plant diseases. Several investigators have described the *in vitro* and *in vivo* activities of these microorganisms. Their modes of action include parasitism of hyphae (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006), oospores or fungal sclerotia (Crawford et al., 1993) competition with pathogens (Kunoh, 2002), antibiotic production (Igarashi, 2004), siderophores (Khamna et al., 2009), herbicides (Hasegawa et al., 2006), and enzymes such as cellulases, hemicellulases, chitinases, amylases, and glucanases (Yuan and Crawford, 1995). In addition, actinomycetes may affect plant growth (Igarashi, 2004). According to Kunoh (2002), endophytic *Streptomyces* may have an important role in the development and health of plants, because *Streptomyces* affects plant growth due to its assimilation of nutrients or production of secondary metabolites.

The tomato (*Lycopersicon esculentum*) is highly susceptible to phytopathogen attack, and tomato crops are among those most intensively treated with agrochemicals. Among the many pathogens that attack tomatoes are *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Sclerotium sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, and *Pectobacterium carotovorum*.

Most of these pathogens not only spread disease in tomato plants, but also affect other crops. According to Cao et al. (2004a), *R. solani* can develop in

both farmed and unfarmed soils, spreading disease in many crops, including rice. *F. oxysporum* attacks banana plants, causing a disease known as fusarium wilt (Cao et al., 2004b), and also infects wheat (Taechowisan et al., 2003). *R. solanacearum* is an important soil pathogen causing bacterial wilt in more than 200 plant species, including the potato, tomato, pea, tobacco, banana, and others (Tan et al., 2006).

Since tomato crops are vulnerable to phytopathogenic bacteria and fungi, this study aimed to select endophytic actinomycetes from tomato plants that are potential biocontrol agents of tomato and other crops, in order to select producers of antimicrobial metabolites, to optimize conditions for the production of metabolites, and to identify the isolate with the highest potential as a biocontrol agent.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Actinomycetes

Seventy endophytic actinomycetes from roots of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) were isolated during 2005 and 2006, from three cities in southern Brazil. Samples were surface-sterilized as described by Cao et al. (2004a) with some modifications. Samples were washed in running water to remove soil particles then immersed in a 70% (v/v) ethanol solution for 5 min, after that in 2.5% NaClO for 10 min. Afterwards they were rinsed three times with sterilized distilled water. The roots sample were cut into fragments of 1cm-long

sections, and five sections were placed in Petri dishes containing different media: starch–casein agar (SCA) medium (10.0g starch, 0.3g casein, 2.0g K₂HPO₄, 2.0g NaCl, 2.0g KNO₃, 0.05g MgSO₄ · 7H₂O, 0.01g Fe₂(SO₄)₃·6H₂O, 15.0 g agar) , S medium (Cao et al., 2004a) and ISP2 agar (Shirling and Gottlieb, 1966). The plates were incubated at 30°C, 37°C, and room temperature for 30 days.

3.2. Antimicrobial activity - Antibiosis

To evaluate the antimicrobial activity of the actinomycetes 15 phytopathogen (bacteria and filamentous fungi) were used as test microorganisms (Table 1). The actinomycetes were spot-inoculated onto SCA medium and incubated at 30°C for 14 days. After this period, the antagonism between actinomycetes and the test microorganisms was evaluated using the double-layer agar method. For this procedure, 10 ml of Mueller-Hinton overlay agar medium was added and inoculated with 10⁹ cells/ml of bacteria, and 10 ml of Sabouraud overlay agar medium was added and inoculated with 10⁶ spores/ml of filamentous fungi. All plates were incubated at 28°C and incubation time of 24-48 h for bacteria and 7-10 days for fungi. All experiments were carried out in duplicate.

3.3. Siderophore production

The production of siderophores by endophytic actinomycetes was evaluated according to methods of Beneduzi et al. (2008). Actinomycetes were spot-inoculated on King B medium supplemented with chrome azurol S complex

[CAS/iron (III)/hexadecyltrimethyl ammonium bromide]. Plates were incubated at 30°C for 14 days. A positive reaction was indicated by yellow zones around the colonies.

3.4. Phosphate solubility

Phosphate solubility was detected according to method of Beneduzi et al. (2008). Actinomycetes were spot-inoculated onto glucose-yeast agar medium (GY) and Petri dishes incubated at 30°C. Subsequently, these microorganisms were inoculated in Petri dishes containing GY medium supplemented with K_2HPO_4 and $CaCl_2$. The dishes were incubated at 30°C for 14 days. A positive reaction was indicated by clear zones around the colonies.

3.5. Indole acetic acid production (IAA)

Actinomycetes were inoculated in King B medium (Glickmann and Dessau, 1995) and the culture was incubated at 30°C for 14 days, in a rotator shaker. Subsequently, the culture was centrifuged and 1 ml of the supernatant was and transferred to test tubes containing 1 ml of Salkowski reagent ($12 \text{ g.l}^{-1} \text{ FeCl}_3 + 7.9 \text{ M H}_2\text{SO}_4$). The mixture was left at room temperature for 30 minutes, and a positive reaction was indicated by a colorimetric reaction.

3.6. Optimization of production of antimicrobial compounds

The actinomycete with the highest inhibition potential shown in the double-layer agar assay was selected and used to optimize the production

conditions of the secondary metabolites. Six different media were tested: starch casein (SC), ISP2 broth, Sahin broth (Sahin and Ugur, 2002), Czapek-Dox broth, Bennett's broth, and TSB; along with three temperatures (25°C, 30°C, 35°C). The pH values of 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, and 12.0 were evaluated when the isolate grew in SC medium. The medium pH was adjusted with the solutions: McIlvaine (pH 4.0 and 5.0), H₂KPO₄ –NaOH (pH 6.0 – 8.0), H₃BO₃.KCl – NaOH (pH 9.0 and 10.0), Ringer (pH 11 - 12) (Assumpção and Morita, 1968).

The selected actinomycete was inoculated into 50 ml of the previously mentioned growth media. After 48 h of growth, a 5 ml aliquot of the inoculum was transferred to a 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of one of the mentioned media. The cultures were grown for 10 days on a shaker at 150 rpm. Once every 48 h, a sample of 1 ml was collected and centrifuged. By means of a sterile cork borer, wells were punctured in plates containing Mueller-Hinton agar previously seeded with 10⁹ cells/ml of bacteria, and plates containing Sabouraud agar seeded with 10⁶ cells/ml of fungi. Subsequently, a 100 µl aliquot of the supernatant was deposited into the wells. The plates were incubated in a refrigerator (4°C) for 18 h, for metabolites diffusion, and afterwards the plates were incubated at 28°C for 24 h. After incubation growth inhibition of the microorganism tested was observed. Each experiment was run in duplicate and repeated twice.

3.7. Characterization of the selected isolate

The isolated strain was characterized morphologically following the directions given by the International *Streptomyces* Project (ISP) (Shirling and Gottlieb, 1966). Its general morphology was determined by direct light microscopy examination of the surface of cultures grown on SCA, ISP2, and starch/mineral salts media (Williams et al., 1983a). The plates were incubated at 37°C for 7 – 10 days. The color of the aerial spore mass of colonies, color of the substrate mycelium, and utilization of carbon and nitrogen sources were determined according to Williams et al. (1983a). Degradation tests and the ability to grow in different salt concentrations were determined according to Williams et al. (1983b). Melanin production was detected by growing the isolates in ISP6 medium (Shirling and Gottlieb, 1966). The ornamentation of the spore surface was observed by scanning electron microscopy after 10 days of incubation in SCA medium.

3.8. DNA sequence analysis

The DNA of isolate R18(6) was extracted according to Oliveira (2003). Amplification of 16S DNA was performed by polymerase chain reaction (PCR). The primers used in the PCR reaction were designed by Edwards et al. (1989), pA (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') and pH (5'AGGAGGTGATCCAGCCGCAC'3). The mixture contained 1 pmol of each primer, 0.75 µl (100 mM) dNTPs mix, 2.5 µl of reaction buffer, 0.75 µl of 50 mM MgCl₂, 1 U Taq polymerase, 200 ng/ µl BSA (bovine serum albumin), 30 ng of DNA, and H₂O. The final working volume was 25

µl. The reaction took place with a 10 min denaturation at 94°C; 35 cycles performed as: 1 min at 94°C, 1 min at 54°C, and 1 min at 72°C. These cycles were followed by a final elongation period for 10 min at 72°C. The amplification product was sequenced in an automated sequencer in the Molecular Biology Laboratory – UFCSPA. The resulting sequence of the R18(6) was compared to all the sequences available in GenBank, using the BLAST software from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The sequence was aligned using the CLUSTAL software. A phylogenetic tree was constructed by using MEGA 4.0 with the neighbor-joining method. Bootstrap analysis (1000 re-samplings) was used to evaluate the topology of the neighbor-joining data.

4. Results

Of the 70 endophytic actinomycetes from tomato plants used in this study, 88.6% (62) showed antimicrobial activity against the test microorganisms. Out of that active actinomycetes, 25 (40.3%) inhibited only bacteria, 4 (6.5%) inhibited only fungi, and 33 (53.2%) inhibited both phytopathogenic bacteria and fungi.

Most actinomycetes that showed antifungal activity inhibited only a few fungi; only three of the actinomycete isolates inhibited all the phytopathogenic fungi. The most susceptible fungi to the bioactive compounds produced by the

actinomycetes were *Rhizoctonia* sp., *B. sorokiniana* 98022, and *Verticillium alboatrum* (Table 1).

The phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (L) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (V) were most susceptible to the compounds. They were inhibited by 51 (82.3%) and 25 (14.3%) of the actinomycetes isolates, respectively (Table 1). *P. carotovorum brasiliensis* and *R. solanacearum* were only inhibited by the isolate R18(6).

The actinomycetes were previously classified by their morphological characteristics as belonging to the genera *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora*, and *Nocardia*. The *Streptomyces* isolates were grouped according to the color of the aerial mycelia. *Streptomyces* isolates with yellow aerial mycelia showed a higher antimicrobial spectrum of activity. Among the 33 actinomycetes that inhibited phytopathogenic bacteria and fungi, 15 isolates belonged to the *Streptomyces* group with yellow aerial mycelia (Table 2).

IAA was produced by 72.1% of the isolates, 16.2% were positive for the phosphate solubility reaction, and 86.8% were positive for siderophore production.

Isolate R18(6) produced metabolites that inhibited all the phytopathogenic isolates tested, produced IAA and siderophores, and was positive for phosphate solubility. R18(6) was then selected for the optimization of antimicrobial compound production. The test results showed that the isolate grew well in all media, temperatures, and pH values tested. However, antimicrobial activity was only observed in SC, TSB, and Czapek-Dox media, when grown at

30°C and 35°C, and at pH values of 6.0, 7.0, and 8.0. The metabolite produced by R18(6) when grown in SC broth, at a temperature of 30°C and pH 7.0 showed the best inhibition zones observed with the diffusion-well method. *P. carotovorum* pv. *brasiliensis* was not inhibited during the optimization tests (Table 3).

R18(6) grew well on ISP2, SCA, and starch casein agar media. Long spore chains were borne on aerial hyphae, the chains were spiral, and the spores were smooth when observed by scanning electron microscopy (Figure 1). The color of the aerial spore mass was gray. Diffusible pigments were not observed on agar media and melanin was not produced on ISP2 medium.

For the physiological studies 33 tests were considered. Isolate R18(6) was able to use L-arabinose, D-fructose, D-galactose, D-mannose, L-rhamnose, D-xylose, *meso*-inositol, D-mannitol, D-raffinose, D-sucrose, sodium acetate as sole carbon sources. As nitrogen sources L-arginine, L-histidine, L-methionine, L-phenylalanine, L-threonine, L-valine, potassium nitrate was used and did not use L-cysteine. Extracellular enzymes production was observed for cellulase, esculin, gelatin liquefaction, pectinase, xanthine and xylanase however, it has a negative response for starch hydrolysis. This isolate grows in a range of temperature from 20 – 37°C and a weak growth occurs in the presence of 3, 5, 7, 10% (w/v) NaCl and 0.0001% of violet cristal.

The partial 16S rDNA sequence (540 nucleotides) of strain R18(6) was determined. The obtained sequence was aligned with all available *Streptomyces* references in the GenBank database. The results confirmed that strain R18(6)

belongs to the genus *Streptomyces*. R18(6) showed 97% of similarity with all *Streptomyces* used to construct the phylogenetic tree. A phylogenetic tree was constructed with R18(6) and the closely related *Streptomyces* species (Figure 2). R18(6) showed a closer relation with *Streptomyces pluricolorescens*. The main physiological differences of R18(6) with the closest *Streptomyces* are shown in table 4.

5. Discussion

Actinobacteria are widely known for their capability to produce bioactive compounds. Most of these microorganisms have been isolated from soil samples. Therefore, researchers have investigated less-explored ecological niches, searching for different microorganisms that could produce new compounds.

Endophytic actinomycetes are a promising source for new bioactive compounds, and have been isolated from several plant species. Bascom-Slack et al. (2009) isolated actinomycetes from the internal tissues of 12 species from 10 different families. Igarashi (2004) isolated 398 actinomycetes from 24 herbaceous, harbor, wild, and agricultural species. Endophytic actinomycetes were isolated from roots of 28 plant species in northeastern Italy (Sardi et al., 1992), and from wheat roots and leaves in northeastern Brazil (Cao et al., 2005). These studies show that actinomycetes are widely distributed in the internal tissues of many plants.

Most of the endophytic actinomycetes from tomato plants used in this study showed antagonistic activity; 88.6% of the isolates showed antimicrobial activity against at least one phytopathogen. The antagonism of endophytic actinomycetes observed in this study is in accordance with previous reports (Castillo et al., 2007; Khamna et al., 2009). According to Valois et al. (1996), actinomycetes showed antagonistic activity against a variety of phytopathogens, such as *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Fusarium*, and *Macrophomina*. Verma et al. (2009) observed that approximately 60% of the isolated actinomycetes showed wide-spectrum antimicrobial activity against bacteria and fungi. According to Minuto et al. (2006), *Streptomyces griseoviridis* had an important role in tomato disease control, and the isolate could also colonize plant roots and stimulate their growth.

Commercially available biocontrol products of actinomycetes, such as Mycostop, Actinovate, and Actinolron, have *Streptomyces* spores as constituents, indicating the general acceptance of this genus's biocontrol activity (Hamdali et al., 2008). Mycostop is registered in several European countries for use on plant crops including cucumber, aubergine, tomato, melon, pepper, and pumpkin (Minuto et al., 2006).

Studies on endophytic actinomycetes have demonstrated the predominance of the genus *Streptomyces* (Bascom-Slack et al., 2009). A similar result is reported in this study, as 55 isolates of a total of 70 were *Streptomyces* sp., the others are distributed among the genera *Microbispora*, *Micromonospora*

and *Nocardia*. According to Verma et al. (2009), in their research the dominant genus was *Streptomyces* (49.1%), followed by *Streptosporangium* (14.5%) and *Microbispora* (10.1%).

Streptomyces, besides being commonly observed in different environments, is also very important for its antimicrobial activity. Of the 55 *Streptomyces* isolates in this study, 49 showed antimicrobial activity. Cao et al. (2004b) observed that *Streptomyces* inhibited the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. The percentages of antibacterial activity observed for the genera *Microbispora*, *Micromonospora*, and *Nocardia* were 88.9%, 100.0%, and 100.0%, respectively. This shows the diversity of bioactive metabolites.

Micromonospora sp. isolated from apparently healthy tomato plants showed a strong inhibitory reaction against *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici* (Hasegawa et al., 2006). *Micromonospora aurantiaca* reduced the impact caused by *Pythium ultimum* on wheat plants when their seeds were covered with the fungus mycelium (Hamdali et al., 2008). *Nocardiopsis dassonvillei* showed antibiotic, mycolic, and parasitic activity against vegetative hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006). *Micromonospora globosa* parasitizes *Fusarium udum* *in vitro* hyphae, and this interaction involves coiling, penetration, and multiplication of the parasite hyphae within the fungus host, leading to granularity, cytoplasmic coagulation, and hyphae lysis (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006).

Production of siderophores is also important for antagonism to phytopathogens and improving growth of the plant (Tan et al., 2006). In this study, the production of siderophores was observed in 86.8% of the isolates. According to Cao et al. (2005), siderophores exhibited considerable structural variability and affinity for iron, which determines the growth of a microbe under competitive conditions when iron availability is a limiting factor. Competition for iron is considered a possible method for phytopathogen control. *Streptomyces* species are known for the production of hydroxamate-type siderophores, which inhibit phytopathogen growth by competing for iron in rhizosphere soils (Khamna et al., 2009). In addition, some plant growth-promoting rhizobacteria increased growth by supplying the plant with sequestered iron. Microbial siderophores are used by plants as a source of iron.

The results obtained here for IAA production are very encouraging, showing a positive reaction for 72.1% of the isolates. However, the results also showed low levels for phosphate solubility (only 16.2% of the isolates). Thus, these microorganisms can also play a role in host plant development, considering that growth promotion effects may be related to IAA production (Khamna et al., 2009) and phosphate solubility (Hamdali et al., 2008). According to Sarwar and Kremer (1995), bacteria selected for their IAA production may be useful in increasing the growth of crops.

Growth for the selected actinomycete R18(6) was observed at all temperatures tested, differently from antimicrobial activity, which occurred only at

30°C and 35°C. According to Ouhdouch et al. (2001), the ideal temperature for growth may be different from the ideal temperature for production. Ideal values for production have established variation levels, normally around 5°C. On the other hand, growth temperature shows less variation. Of the temperatures used in this study, the results indicated that production was better at the lower temperatures.

Pectobacterium carotovorum pv. *brasiliensis* was inhibited by the isolate R18(6) using the double-layer method tests, although the well-diffusion tests showed no inhibition. It has been established that solid medium is more appropriate for the development of the isolates and the production of antibiotics. Pandey (2006) also observed that the actinomycetes showed antimicrobial activity when grown in agar medium, but not when grown in liquid cultures. However, opposite results were obtained by Bachiega et al., (2008), whose study with actinomycetes showed higher activity when they were grown in liquid cultures. According to Nkanga and Hagedorn (1978), the size of the inhibition zone depends on the antibiotic diffusion levels; antibiotic production in liquid cultures is usually low, and detection of compounds requires high concentration levels.

In the optimization conditions, R18(6) was most efficient when grown at 30°C. Reduction in the size of haloes was observed at higher temperatures, and in these conditions the activity was observed at later periods of growth. It is noteworthy that this experiment used endophytic actinomycetes, bacteria that are not normally exposed to wide climate variation or to high temperatures.

The result obtained with the phylogenetic tree shows the R18(6) isolate more related to *Streptomyces pluricologrescens*. However this relation was not confirmed when high bootstrap threshold were chosen (1000). Apart from that, the isolate R18(6) belongs to the *Streptomyces* group with gray aerial mycelium and spiral spore chains while the *S. pluricologrescens* belongs to the group with yellow or red mycelium and chains of spore spiral- rectiflexibiles. Since this isolates also showed different physiological response to some biochemical tests as saccharose, *meso*-inositol and raffinose utilization we may suggest that R18(6) isolate is a novel one. This suggestion, can be confirmed with the sequence analysis of all 16S ribosomal DNA.

The endophytic actinomycetes from tomato plants used in this study are potential biocontrol agents, specially the isolate R18(6). The potential of the isolate is determined by its antimicrobial activity, siderophore production, IAA production, and phosphate solubility. Selected microorganisms must be tested *in vivo* to assess the efficiency of biocontrol activity and/or growth promotion.

6. Acknowledgments

We thank Dr. Valmir Duarte of the Plant Health Department of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and Dr. Andréa Bittencourt Moura of the Plant Health Department of the Universidade Federal de Pelotas for their kind donation of the phytopathogenic microorganisms used in this study. This work was supported by grants from CAPES.

7. References

- Assumpção, R.M.V., Morita, T., 1968. Manual de soluções, reagentes e solventes. Padronização, preparação e purificação. Ed Edgar & Blücher Ltda, p.627.
- Bachiega, G.L., Vilegas, W., Ujikawa, K., 2005. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. Ver. Ciênc. Farm. Apl. 26, 29-35.
- Bascom-Slack, C.A, Ma, C., Moore, E., Babbs, B., Fenn, K., Greene, J.S., Hann, B.D., Keehner, J., Kelley-Swift, E.G., Kembaiyan, V., Lee, S.J., Li, P., Light, D.Y., Lin, E.H., Schorn, M.A., Vekhter, D., Boulanger, L., Hess, W.M., Vargas, P.N., Strobel, G.A., Strobel, A.S., 2009. Multiple, novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests. Microbiol. Ecol. 58, 374-383.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.K., Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia, L.M.P., 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. Appl. Soil Ecol. 39, 311-320.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S., 2004a. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Lett. App. Microbiol. 39, 425-430.
- Cao, L., Qiu, Z., Daí, X., Tan, H., Lin, Y., Zhou, S., 2004b. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their

activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. World J. Microbiol. Biotechnol. 20, 501-504.

Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S., 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiol. Lett. 247, 147-152.

Castillo, U.F., Browne, L., Strobel, G., Hess, W.M., Ezra, S., Pacheco, G., Ezra, D., 2007. Biologically active endophytic Streptomyces from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia. Microbiol. Ecol. 53, 12-19.

Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M., Ousley, M.A., 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3899-3905.

Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes, characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 17, 7843-7853.

El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K., 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biological agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biol. Biochem. 38, 1505-1520.

Glickmann, E., Dessaux, Y., 1995. A critical examination of the specificity of Salkowski reagent of indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61, 793-796.

Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M.J., Ouhdouch, Y., 2008. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing

actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Appl. Soil Ecol.* 40, 510-517.

Hasegawa, S., Meguro, A., Shimizu, M., Nishimura, T., Kunoh, H., 2006. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetologia.* 20, 72-81.

Igarashi, Y., 2004. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. *Actinomycetologia.* 18: 63-66.

Khamna, S., Yokota, A., Lumyong, S., 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 649-655.

Kunoh, H., 2002. Endophytic Actinomycetes: Attractive Biocontrol Agents. *J. Gen. Plant Pathol.* 68, 249-252.

Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2006. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protection* 25, 468-475.

Nkanga, E., Hagedorn, C., 1978. Detection of antibiotic-producing *Streptomyces* inhabiting forest soils. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 14, 51-59.

Oliveira, M.F., 2003. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 125p.

Ouhdouch, Y., Barakate, M., Finance, C., 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Europ. J. Soil Biol.* 37, 69-74.

Pandey, B., Ghimire, P., Agrawal, V.P., 2006. www.aehms.org/pdf/Pandey%20f.pdf

Sahin, N., Ugur, A., 2002. Investigation of the Antimicrobial Activity of Some *Streptomyces* Isolates. *Turk J. Biol.* 27, 79-84.

Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Bergonovi, G.E., Serdi, S., 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2691-2693.

Sarwar, M., Kremer, R.J., 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett. Appl. Microbiol.* 20, 282-285.

Shirling, E.B.; Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16,313-340.

Shirling, E.B., Gottlieb, D., 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* II. *Species descriptions from first study.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18, 69-189.

Shirling, E.B., Gottlieb, D., 1972. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22, 265–394.

Taechowisan, T., Peberdy, J.F., Lumyong, S., 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 381-385.

Tan, H.M., Cao, L.X., He, Z.F., Su, G.J., Lin, B., Zhou, S.N., 2006. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro. World J. Microbiol. Biotechnol. 22, 1275-1280.

Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Déry, C., Brzezinski, R., Beaulieu, C., 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1630-1635.

Verma, V.C., Gond, S.K., Kumar, A., Mishra, A., Kharwar, R.N., Gange, A.C., 2009. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, diversity, and anti-microbial activity. Microbiol. Ecol. 57, 749-756.

Williams, S.T., Goodfellow, M., Wellington, M.H., Vickers, J.C., Alderson, G., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J., Mortimer, A.M., 1983a. A probability matrix for identification of some Streptomycetes. J. Gen. Microbiol. 129, 1815-1830.

Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, M.H., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J., 1983b. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. J. Gen. Microbiol. 129, 1743-1813.

www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?species. Acesso em 23/03/2010.

Yuan, W.M., Crawford, D., 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYE108 as potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3119-3128.

Table 1: Percentage of the endophytic actinomycetes, with antimicrobial activity against phytopatogenic bacteria and filamentous fungi in the double layer assay.

Bacteria	Percentage	Filamentous fungi	Percentage
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (L) ^a	40.3	<i>Alternaria solani</i> ^a	21.0
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (V) ^a	82.3	<i>Bipolaris sorokiniana</i> 17 ^b	25.8
<i>Pectobacterium carotovorum brasiliensis</i> ^c	1.6	<i>Bipolaris sorokiniana</i> 98022 ^b	37.1
<i>Ralstonia solanacearum</i> ^a	1.6	<i>Fusarium. oxysporum</i> fsp. <i>lycopersici</i> ^a	25.8
<i>Ralstonia solanacearum</i> ^b	1.6	<i>Gerlachia oryzae</i> ^a	11.3
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ^c	6.5	<i>Rhizoctonia</i> sp. ^a	38.7
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ^c	9.7	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ^a	24.2
		<i>Verticillium alboatrum</i> ^a	35.5

^a Samples from the Plant Health Department from the Universidade Federal de Pelotas.

^b Samples from our laboratory.

^c Samples from the Plant Health Department from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Table 2: Percentage of actinomycetes with antagonistic activity against phytopathogenic bacteria and fungi and percentage of isolates with positive reaction to IAA, siderophore and phosphate solubility.

Isolates (n=70)	B	F	AIA	S	P
<i>Streptomyces</i> Gray (n=31)	83.9	41.9	64.5	80.7	19.4
<i>Streptomyces</i> Yellow (n=19)	84.2	89.5	89.5	100.0	21.1
<i>Streptomyces</i> White (n=4)	25.0	75.0	75.0	100.0	25.0
<i>Streptomyces</i> Brown (n=1)	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0
<i>Microbispora</i> sp. (n=9)	88.9	22.2	22.2	44.4	0.0
<i>Micromonospora</i> sp.(n=3)	100.0	33.3	100.0	100.0	0.0
<i>Nocardia</i> sp. (n=3)	100.0	0.0	100.0	100.0	0.0

B = bacteria, F = filamentous fungi, AIA = Indoleacetic acid, P = phosphate solubility.

Table 3: Inhibition haloes (mm) produced by isolate R18(6) against the phytopatogens when grown in TSB, Czapek-Dox and Starch casein media, at temperatures of 30 and 35°C and pH 6, 7 e 8.

Phy	TSB		Czapek-Dox		SC					
	30°C	35°C	30°C	35°C	30°C		35°C			
topa					6.0	7.0	8.0	6.0	7.0	8.0
thog										
ens										
1	12	0	0	0	12	14	12	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	15	12	12	0	15	18	14	12	12	0
4	20	18	19	15	21	26	24	15	19	18
5	14	12	0	0	14	18	16	12	15	13
6	16	14	14	12	17	20	17	15	15	14
7	14	14	12	0	12	16	13	12	15	14

Phytopathogens used as test microorganisms for the production optimization assay: 1 - *R. solanacearum*; 2 - *P. carotovorum*; 3 - *X. campestris*; 4 - *X. axonopodis*; 5 - *C. michiganensis*; 6 - *F. oxysporum lycopersici*; 7 - *Rhizoctonia* sp.

Table 4: Biochemical response of *Streptomyces* sp. R18(6) compared with those of similar *Streptomyces* species.

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp. R18(6)	<i>Streptomyces pluricolorscens</i> ²	<i>Streptomyces avidinii</i> ¹	<i>Streptomyces enissocaeisilis</i> ³	<i>Streptomyces mutabilis</i> ²	<i>Streptomyces rochei</i> ¹	<i>Streptomyces fungicidicus</i> ¹	<i>Streptomyces djakartensis</i> ³
Spore chain	+	+	+	+	+	+	+	-
Spore chain <i>Retinaculiaperti</i>	-	-	+	-	+	-	ND	-
Spores chain <i>Rectiflexibiles</i>	-	+	+	+	-	-	ND	-
Spore chains <i>Spirales</i>	+	-	-	-	+	+	ND	-
Spores mass red	-	+	+	-	-	-	-	-
Spores mass gray	+	-	-	-	+	+	-	-
Spore surface smooth	+	+	+	+	+	+	ND	
Spore surface hairy, spiny or warty	-	-	-	-	-	-	ND	
Diffusible pigment produced	-	-	-	-	-	-	-	
Melanin on tyrosine agar	-	-	-	+	-	-	-	+
Utilization of								
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	-	+	+	+	+	+
Sucrose	+	-	D	+	+	-	D	+
<i>meso</i> -Inositol	+	-	-	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	-	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	+	D	+	+	+	D	+
Raffinose	+	-	-	+	-	-	D	+
D-Fructose	+	+	-	-	+	+	+	+
L-Arabinose	+	D	-	+	+	-	D	+

D: doubtful; ND: not determined

¹: Shirling and Gottlieb (1972)

²: Shirling and Gottlieb (1968)

³: WWW.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?species

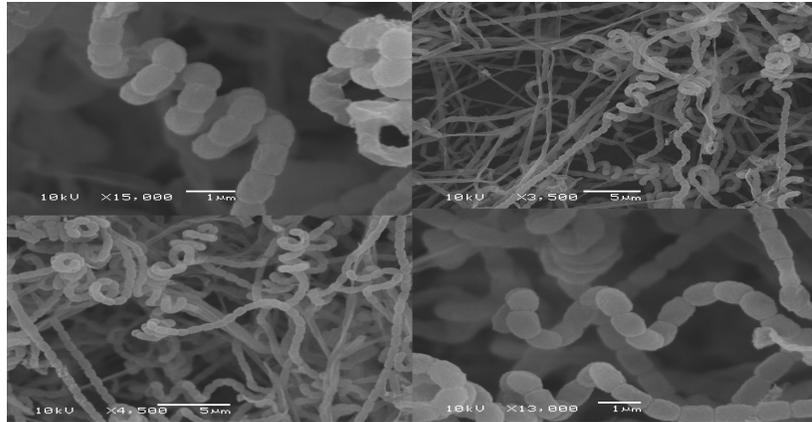


Figure 1: *Streptomyces* R18(6) scanning electron micrograph. A seven days culture on starch-casein agar. Chains of spores in spiral shape with smooth surface.

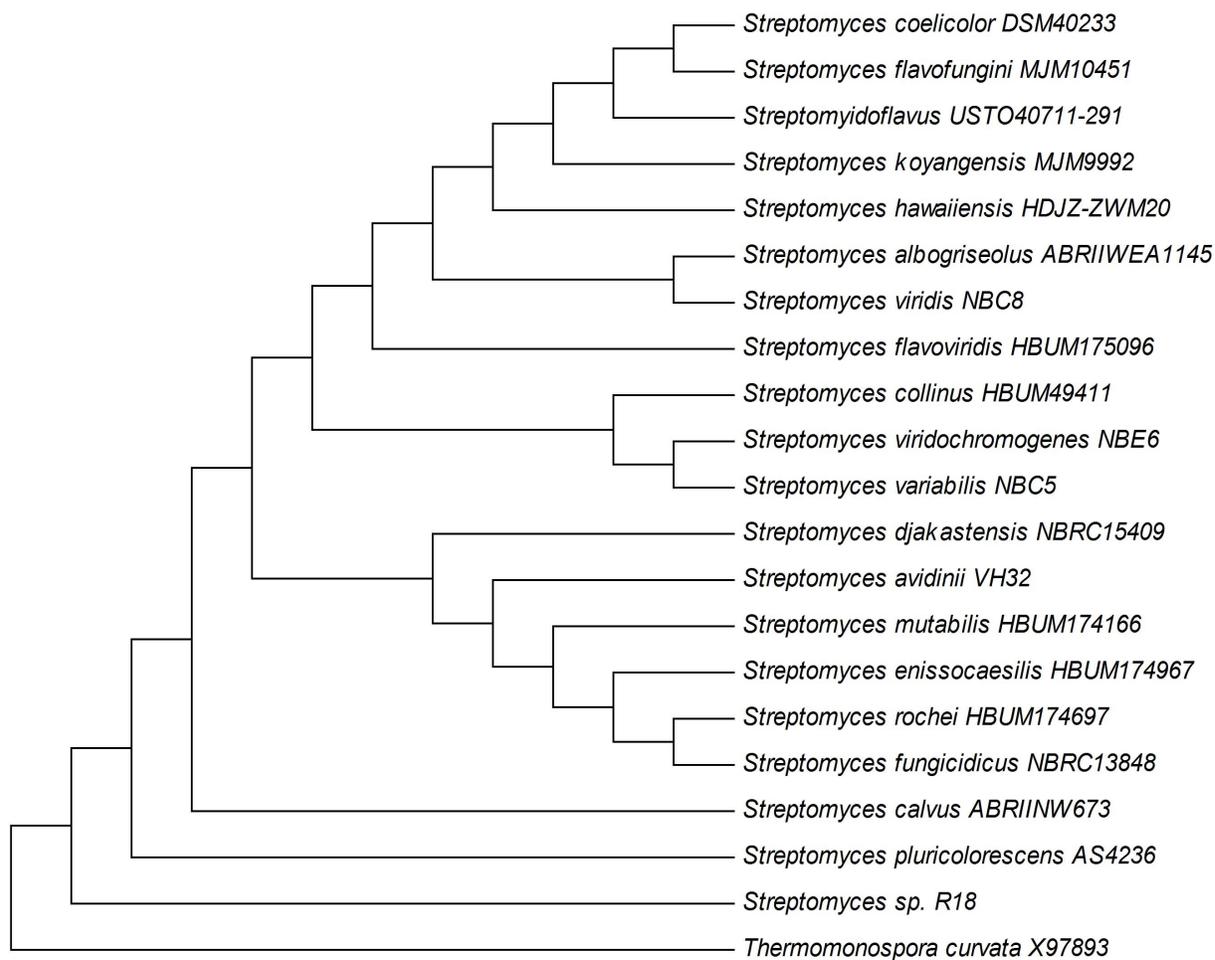


Figure 2: Phylogenetic dendrogram obtain by neighbord-joining analysis based on 540 bp. Of 16 rDNA gene sequences, showing the position of strain R18(6) among its phylogenetics neighbord.

CAPÍTULO 3

**Avaliação do potencial de biocontrole do isolado *Streptomyces* sp. R18(6)
endofítico de tomateiro contra *Ralstonia solanacearum***

Avaliação do potencial de biocontrole do isolado *Streptomyces* sp. R18(6) endofítico de tomateiro contra *Ralstonia solanacearum*

1. Resumo

Murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* é uma das principais moléstias que atacam o tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), ocorre em todo território brasileiro e pode ocasionar perdas totais. Métodos de controle são pouco eficazes, por isto medidas alternativas, como o controle biológico, estão sendo procuradas. Portanto, este trabalho teve como objetivo o biocontrole da murcha bacteriana empregando o isolado *Streptomyces* sp. R18(6) um actinomiceto endofítico de tomateiro. Para tanto foram realizados testes para verificar a capacidade do actinomiceto colonizar as raízes de tomateiro, testes em casa de vegetação empregando seis tratamentos diferentes de controle da doença, análise da altura e peso fresco das plantas de tomates sobreviventes e sem sintomas após o término do experimento e análise do potencial enzimático do isolado. Os resultados mostraram que o isolado *Streptomyces* sp. R18(6) conseguiu colonizar as raízes de tomateiro, impediu o desenvolvimento da murcha bacteriana em casa de vegetação e apresentou bom potencial enzimático e, portanto pode ser considerado um promissor agente de biocontrole.

2. Introdução

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) destaca-se no cenário mundial como sendo o produto olerícola de maior difusão mundial para consumo fresco ou processado (Camargo & Camargo Filho, 2008). Segundo dados da FAO, a produção mundial em 2007 foi de, aproximadamente, 130 milhões de toneladas. O Brasil encontra-se entre um dos dez maiores produtores de tomate do mundo com 3.431.230 toneladas.

Entretanto esta importante cultura é bastante suscetível a fitopatógenos, mais de 200 já foram relatados (Filho et al., 2008). Entre as

diversas doenças que afetam esta cultura podemos destacar a murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*. Esta doença é considerada uma das mais importantes e prejudiciais moléstias bacterianas de plantas, em especial nas regiões tropicais (Lwin & Ranamukhaarachch, 2006). No Brasil, as culturas mais afetadas por este microrganismo são as solanáceas, como batata, tomate, pimentão, berinjela e jiló, mas também inclui a bananeira (Bringel et al., 2001).

O controle desta enfermidade é difícil, isto se deve, principalmente, à grande variabilidade genética da bactéria, ausência de cultivares resistentes (Moura & Romeiro, 1999) e devido ao fato da bactéria apresentar grande variedade de hospedeiros (Thanh et al., 2009). O controle químico é ineficiente (Lopes & Santos, 1994) e o controle pela prática de rotação de culturas tem apresentado efeito reduzido devido à capacidade de *R. solanacearum* sobreviver tanto em hospedeiros alternativos como no solo (Gava et al., 2002).

O emprego do controle biológico tem se mostrado uma alternativa para o controle da doença. Segundo Lwin & Ranamukhaarachch (2006) o controle biológico não somente reduz a doença e aumenta a produção, mas também pode prevenir a poluição ambiental ocasionada pelo uso de pesticidas.

O uso de actinomicetos como potenciais agentes de biocontrole data de longo tempo (Moura & Romeiro, 1999) e vários resultados promissores já foram relatados para o controle de fitopatógenos do tomateiro (Filho et al., 2008; Souza, 2006; Cao et al, 2004; Gava et al., 2002; Moura et al., 1998;).

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial de controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro empregando o isolado *Streptomyces* sp. R18(6). Este isolado é endofítico de tomateiro e foi escolhido por apresentar atividade antimicrobiana *in vitro* contra vários fitopatógenos, inclusive contra *R. solanacearum* (Oliveira et al., 2009 , submetido para publicação).

3. Material e métodos

3.1. Obtenção dos isolados

Ralstonia solanacearum empregada neste estudo foi gentilmente doada por Dra. Andréa B. Moura, do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas-RS.

O *Streptomyces* R18(6) é um actinomiceto endofítico de tomateiro que foi selecionado por demonstrar potencial para agente de biocontrole (Oliveira et al., 2009, submetido para publicação). Nos testes realizados *in vitro*, o isolado apresentou atividade antimicrobiana contra diversos fitopatógenos e também produziu ácido indol acético, sideróforos e solubilizou fosfato.

3.2. Colonização *in vitro* das raízes de tomateiro por *Streptomyces* sp. R18(6).

Para avaliar a capacidade *in vitro* do isolado *Streptomyces* sp. R18(6) colonizar as raízes de tomateiro foi utilizado o protocolo descrito por Souza (2006)

com modificações. Sementes de tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada foram desinfestadas através da imersão em etanol 70% (5 minutos) e hipoclorito de sódio 2,5% (10 minutos). Posteriormente, foram enxaguadas três vezes em água destilada estéril e transferidas para tubos de ensaio contendo ágar-água com 0,6% de ágar. Os tubos foram incubados a 30°C, no escuro, até que ocorresse a emissão da radícula, somente então os esporos do isolado crescido no ágar amido caseína (Frighetto & Valarini, 2000) foram transferidos, com o auxílio de uma agulha, para a região próxima à radícula. Os tubos foram mantidos a temperatura e luminosidade ambiente e a observação da colonização das raízes foi realizada diariamente.

3.3. Microbiolização das sementes

Para a microbiolização, sementes de tomateiro Santa Cruz Kada foram desinfestadas através da imersão em etanol 70% (5 minutos) e hipoclorito de sódio 2,5% (10 minutos) em seguida enxaguadas três vezes em água destilada estéril. Posteriormente, as sementes foram imersas por 24 horas em uma suspensão de 10^8 UFC/mL do isolado *Streptomyces* sp. R18(6). Esta suspensão foi obtida através do crescimento do isolado no caldo amido caseína, a 30°C, 120 rpm, por sete dias.

3.4. Bioensaio em casa de vegetação

O estudo em casa de vegetação foi realizado para averiguar a capacidade do *Streptomyces* sp. R18(6) controlar a murcha bacteriana *in vivo*. Para a realização deste experimento foram empregados seis tratamentos. Cada tratamento foi realizado em vasos contendo 5 kg de substrato comercial para hortaliças esterilizado. Em cada vaso (40x15x15cm) foram semeadas 10 sementes. As sementes tratadas com o actinomiceto foram microbiolizadas como descrito anteriormente e o solo foi infestado com *R. solanacearum* por encharcamento, utilizando uma suspensão bacteriana de 10⁹UFC/mL, na proporção de 0,5mL/g de solo (Moura et al., 1998). Tratamentos empregados foram:

- Tratamento 1 (controle): Sementes imersas em caldo amido caseína / Solo sem infestação.
- Tratamento 2: Semente microbiolizada com *Streptomyces* sp. R18(6) / Solo sem infestação.
- Tratamento 3: Semente microbiolizada com *Streptomyces* sp. R18(6) / Solo infestado com *R. solanacearum*.
- Tratamento 4: Semente sem tratamento / Solo com *R. solanacearum* e com *Streptomyces* sp. R18(6).

- Tratamento 5: Semente sem tratamento / Solo com *R. solanacearum*.
- Tratamento 6: Semente microbiolizada com *Streptomyces* sp. R18(6) / *R. solanacearum* por aspersão.

Nos tratamentos 3, 4 e 5, o solo foi infestado com *R. solanacearum* no 15º dia. No tratamento 4, o antagonista foi adicionado ao solo empregando uma suspensão bacteriana de 10⁸ UFC/mL, o mesmo foi adicionado no momento do plantio das sementes. No tratamento 6, o patógeno foi borrifado sobre as folhas de tomateiro no trigésimo dia. O experimento foi mantido por 45 dias em casa de vegetação, com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 28°C. Foram realizadas duas repetições em períodos diferentes. Nas duas repetições as plantas foram molhadas em intervalos de 48 h. Entretanto, na primeira vez que o experimento foi montado as plantas receberam somente água estéril. Na segunda vez, as plantas receberam, além da água, uma solução de sais minerais uma vez por semana.

Ao final do experimento foram determinados o peso fresco e a altura da parte aérea das plantas de tomateiro e o número de plantas vivas.

3.5. Isolamento de *R. solanacearum* e de *Streptomyces* sp.R18(6) do solo e das raízes do tomateiro após o cultivo

Após o término do experimento as plantas de tomateiro foram retiradas e o solo foi analisado, quanto à presença e a quantidade UFC do *Streptomyces*

sp. R18(6) e de *R. solanacearum*. De cada tratamento foram retiradas 10 g de solo e este foi ressuspendido em 90 mL de água destilada estéril. A mistura foi agitada por 30 minutos a 100 rpm sob agitação orbital. Para a quantificação dos microrganismos, 1 mL de cada amostra foi retirado e realizou-se diluições sucessivas até 10^{-6} e 100 μ L das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas nos meios de cultura 523 e amido caseína, para o isolamento de, respectivamente, *R. solanacearum* e *Streptomyces* sp. R18(6). Posteriormente, as placas foram incubadas a 28°C.

As raízes de tomateiro foram lavadas em água corrente para remover o excesso de matéria orgânica e então foram desinfestadas em etanol 70% (5 minutos) e 2,5% de hipoclorito de sódio (10 minutos) e enxaguadas três vezes em água destilada estéril. Posteriormente, as raízes foram cortadas e depositadas sobre os meios ágar amido caseína e 523 e incubadas a 28°C, respectivamente, por 15 dias e 24-48 horas.

3.6. Potencial enzimático

O potencial enzimático do *Streptomyces* sp. R18(6) foi avaliado para a produção das seguintes enzimas: amilase, proteinase, celulase, pectinase e lipase. Todos os meios de cultura foram inoculados em picada e as placas foram incubadas a 30°C por um período de dez dias.

A degradação do amido foi avaliada no meio ágar amido (10,0 g de amido, 5,0 g de peptona, 3,0 g de extrato de carne, 0,5 g de cloreto de sódio, 15,0 g de ágar, 1000 mL de água destilada). Após o período de incubação foi adicionado lugol sobre as colônias. A produção da enzima amilase foi detectada pela descoloração do meio em torno da colônia, devido à hidrólise do amido.

Para verificar a produção da proteinase empregou-se o meio contendo caseína. A formação de uma zona clara ao redor da colônia indicou resultado positivo.

A avaliação da atividade celulolítica foi realizada em placas contendo meio mínimo de sais minerais (Tuncer et al., 2004) suplementado com 0,5% de carboximetilcelulose (CMC). Para visualização dos halos de hidrólise as placas foram coradas com uma solução de Vermelho Congo 0,1% e descoradas com uma solução de NaCl 1M. Posteriormente, verificou-se a formação de um halo vermelho em torno das colônias, indicando a atividade celulolítica.

Para verificar a produção da enzima pectinase os isolados foram inoculados em placas contendo meio triptona caseína de soja (TSA) suplementado com 1% de pectina cítrica. Para a avaliação da atividade pectinolítica CaCl_2 1M foi adicionado sobre as colônias para verificar a formação de halo.

A atividade lipolítica foi detectada em meio ágar nutriente contendo solução de rodamina B 0,001% e óleo de oliva 2,5%. Após o período de

incubação a produção da enzima lipase foi determinada na presença da radiação UV de 350nm. Os isolados positivos produziram fluorescência laranja.

3.7. Testes estatísticos

ANOVA foi empregada para avaliar se houve diferença significativa entre o experimento realizado pela primeira vez e a segunda. Teste de Tukey foi utilizado para determinar se houve ou não diferença significativa entre os tratamentos.

4. Resultados

Streptomyces sp. R18(6) demonstrou capacidade para colonizar *in vitro* as raízes de tomateiro, pois ao redor das raízes pode-se observar turbidez decorrente do crescimento do antagonista.

Ocorreu diferença significativa ($p < 0,001$), teste de Tukey entre os tratamentos, no que diz respeito à proteção das plantas de tomateiro contra *R. solanacearum*. Os tratamentos 5 e 6 diferiram dos demais e entre si. Nestes dois tratamentos o número de plantas mortas ao final do experimento, devido à murcha bacteriana, foi significativamente, maior do que nos demais. Quando as sementes foram tratadas com o antagonista não foi verificada diferença em relação ao controle, tratamento 1, mesmo em solo infestado (Tabela 1), plantas cujas

sementes ou o solo foi tratado com o antagonista não apresentaram sintomas da doença, mostraram-se viçosas até o final do experimento (Figura 1).

Ocorreu diferença significativa ($p < 0,001$) (ANOVA) na altura da parte aérea das plantas e do peso fresco, nos dois experimentos. Pôde-se observar que na 1ª repetição ocorreu ligeira promoção de crescimento nos tratamentos 2 e 4, enquanto que na 2ª repetição ocorreu pequena redução. No tratamento 5 verificou-se redução significativa (teste de Tukey) nos valores dos dois parâmetros nas duas repetições (Tabela 1 e 2). Entretanto, observou-se que houve redução do peso fresco das plantas em todos os tratamentos, em relação ao controle.

Ao final do experimento o antagonista *Streptomyces* sp. R18(6) pôde ser isolado do solo de todos os tratamentos ao qual foi adicionado bem como das raízes, a contagem do isolado no solo variou de $1,7 \times 10^5$ a $2,3 \times 10^6$ UFC/g de solo (Tabela 2). *R. solanacearum* foi isolada do solo nos tratamentos 3, 4 e 5 e sua contagem mais elevada $6,2 \times 10^5$ UFC/g ocorreu no tratamento 5 (Tabela 2).

Os resultados encontrados para avaliar o potencial enzimático do *Streptomyces* R18(6) revelaram que o mesmo produz: amilase, proteinase, celulase, pectinase.

5. Discussão

A murcha-bacteriana do tomateiro ocasionada pela bactéria *R. solanacearum* é uma doença limitante para a cultura do tomateiro e ocorre em

todo território nacional. No Amazonas o cultivo de tomateiros suscetíveis pode acarretar perda total (Netto et al., 2003). Além disto, seu controle é dificultado pela falta de medidas de controle eficientes (Moura & Romeiro, 1999), portanto medidas alternativas como o controle biológico vem sendo tomadas.

Embora se saiba que, na maioria das vezes, não ocorre uma correlação significativa entre antagonismo demonstrável em cultura e efetividade em condições de campo (Moura et al., 1998), o isolado R18(6) foi selecionado por apresentar potencial *in vitro* para controle de diferentes fitopatógenos tanto da cultura do tomate como de outras culturas (Oliveira et al., 2009, submetido para publicação). O isolado demonstrou possuir capacidade para colonizar as raízes de tomateiro, pois ao redor das mesmas foi verificado o crescimento do microrganismo inoculado. Como este meio contém somente ágar, sugere-se que o R18(6) cresceu utilizando os exsudados liberados pelas raízes.

A microbiolização das sementes com o *Streptomyces* sp. R18(6) (tratamentos 2, 3 e 6) e a incorporação do mesmo ao solo (tratamento 4) foi capaz de proteger o tomateiro contra a murcha bacteriana. Nestes tratamentos as plantas permaneceram viçosas e sem sintomas aparentes da doença até o término do experimento. Além disto, o número de plantas mortas com sintomas de murcha bacteriana ocorreu somente no tratamento 5. Não se pode afirmar qual foi o mecanismo de proteção empregado pelo microrganismo, mas pode-se inferir

alguns: a indução de resistência sistêmica, produção de antibiótico, produção de sideróforo ou competição por nutrientes.

O tratamento das sementes e a incorporação do *Streptomyces* sp. R18(6) ao solo, antes do patógeno, pode ter induzido o surgimento de resistência sistêmica. No trabalho de Moura et al. (1998) também ocorreu a proteção das plantas de tomate contra a murcha bacteriana e os autores sugeriram que tenha ocorrido indução de resistência sistêmica, visto que o antagonista também havia sido adicionado antes do patógeno.

O actinomiceto inibiu *R. solanacearum* no teste de antibiose empregando a técnica da dupla camada (Oliveira et al., 2009, submetido para publicação), indicando a produção de moléculas bioativas. Actinomicetos são reconhecidamente importantes pela produção de antibióticos com aplicações em diferentes áreas (Fguira et al., 2004). Antibióticos deste grupo de bactérias têm sido empregados em diversos trabalhos para controle de fitopatógenos (Hasegawa et al., 2006). Silva et al. (2008) verificaram que, dos 52 isolados endofíticos de diferentes espécies, nove promoveram o controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.

Pode-se observar que quando o experimento foi realizado pela primeira vez, altura da parte aérea e o peso fresco das mudas foram menores do que na segunda vez quando ocorreu ganho de altura das plantas nos tratamento 2 e 4 (primeira repetição) em relação ao controle. A diferença entre as repetições pode

estar relacionada com o fato de que na 2ª repetição as plantas receberam além de água, solução de sais minerais. Desta forma, sugere-se que esta diferença esteja relacionada à adição de nutrientes ao solo principalmente durante a 1ª repetição.

Moura & Romeiro (2000) verificaram relação entre actinomicetos responsáveis pela promoção de crescimento do tomateiro e atividade antimicrobiana *in vivo* contra diferentes isolados de *R. solanacearum*. No trabalho realizado por Cao et al. (2004), *Streptomyces* S30 protegeu o tomateiro e promoveu aumento significativo do crescimento. Entretanto, apesar, do tomateiro ter ganhado altura, deve-se considerar a ocorrência da perda de peso em todos os tratamentos. Desta forma, não se pode afirmar que o isolado R18(6) foi um agente de promoção de crescimento do tomateiro.

Ralstonia solanacearum pôde ser recuperada do solo e também das raízes indicando que a mesma conseguiu invadir o sistema vascular das plantas e ocasionar a doença. O isolado *Streptomyces* sp. R18(6) pôde ser recuperado das amostras do solo e também das raízes, indicando a sua persistência. Um dos pré-requisitos para um potencial agente de biocontrole é que tenha capacidade para sobreviver no solo e suporte as variações ambientais. Os estreptomicetos são favorecidos neste sentido, pois produzem esporos que favorecem a sua permanência no ambiente quando as condições tornam-se adversas para a maioria dos microrganismos e também apresentam grande diversidade metabólica.

A produção de enzimas é importante para um agente de biocontrole. As enzimas podem ser utilizadas para permitir a colonização dos tecidos das plantas, podem agir como agentes de biocontrole lisando a parede celular dos fitopatógenos, ou podem disponibilizar nutrientes para as plantas.

Microrganismos celulolíticos desempenham um papel importante na decomposição da matéria orgânica e conseqüente promoção de crescimento de plantas por meio da mineralização de nutrientes. Também podem agir como agentes de biocontrole de microrganismos que possuem celulose na composição da parede celular, como alguns gêneros de fungos fitopatogênicos, como *Phytophthora* e *Pythium* (Souza, 2006).

Os resultados preliminares indicam que *Streptomyces* sp. R18(6) apresentou potencial como agente de biocontrole da murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* em casa de vegetação, impedindo a manifestação da doença. Entretanto, resultados devem ser confirmados em experimento em campo.

6. Agradecimentos

Ao professor Marcelo Gravina, chefe do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter permitido a utilização das instalações da casa de vegetação.

7. Referências

- BRINGEL, J.M.M.; TAKATSU, A.; UESUG, C.H. Colonização radicular de plantas cultivadas por *Ralstonia solanacearum* biovars 1, 2 e 3. *Scientia Agricola*, v.58, n.3, p.497-500, 2001.
- CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strain from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Letters in Applied Microbiology*, v.39, p.425-430, 2004.
- CAMARGAO, P.F.; CAMARGO FILHO, W.P. Produção de tomate de mesa no Brasil, 1990-2006: contribuição da área e da produtividade. *Horticultura Brasileira*, v.26, S1018-S1021, 2008.
- EL-TARABILY, K.A. AND SIVASITHAMPARAM, K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology & Biochemistry*, v.38, p.1505-1520, 2006.
- FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em: <<http://WWW.fao.org>>. acesso em 12 de novembro de 2009.
- FGUIRA, L.F.; FOTSO, S.; AMEUR-MEHDI, R.B.; MELLOULI, L.; LAATSCH, H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. Strain US80. *Research in Microbiology*, v.156, p.341-344, 2005.
- FILHO, R.C.; ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O. Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophiliscinus*. *Tropical Plant Pathology*, v.33, n.6, p.457-460, 2008.
- FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. (2000) Indicadores Biológicos e Bioquímicos da Qualidade do Solo. EMBRAPA. Jaguariúna. 198p.
- GAVA, C.A.T.; PEREIRA, J.C.; FERNANDES, M.C.; NEVES, M.C.P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, n.10, p.1373-1380, 2002.
- HASEGAWA, S.; MEGURO, A.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNOH, H. Endophytic and their interactions with host plants. *Actinomycetologica*, v.20, p.72-81, 2006.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. Doenças do tomateiro. Brasília, EMBRAPA, 1994, 61p.

LWIN, M.; RANAMUKHAARACHCHI, S.L. Development of biological control of *Ralstonia solanacearum* through antagonistic microbial populations. International Journal Agriculture & Biology, v.8, n.5, p.657-660, 2006.

KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; LUMYONG, S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.25, p.649-655, 2009.

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S. Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). Ciência e Agrotecnologia, v.23, n.2, p.281-288, 1999.

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S.; NEVES, M.C.P. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.3, n12, p2065-2072, 1998.

NETTO, R.A.C.; PEREIRA, B.G.; NODA, H.; BOHER, B. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no estado do Amazonas. Fitopatologia Brasileira, v.28, n4, p.362-366, 2003.

SILVA, J.R.C.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias Endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. Ciência e Agrotecnologia, v.32, n.4, p.1062-1072, 2008.

SOUZA, C.S. Estreptomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole da meloidoginose no tomateiro. 2006. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 2006.

THANH, D.T.; TARN, L.T.T.; HANH, N.T.; TUYEN, N.H.; BHARATHKUMAR, SRINIVASAN, LEE, S.Y.; PARK, K. Biological control of soilborne diseases on tomato, potato and black pepper by selected PGPR in the greenhouse and field in Vietnam. Plant Pathology Journal, v.25, n.3, p.263-269, 2009.

Tabela 1: Altura, peso fresco e número de plantas de tomateiro vivas ao final do experimento inoculadas ou não com *Ralstonia solanacearum* e tratadas ou não com *Streptomyces* sp. R(18(6), 1ª repetição.

Tratamento	<i>R. solanacearum</i>		<i>Streptomyces</i> sp. R18(6)		Altura	Peso fresco	Nº plantas vivas
	Aspersão	Encharcamento	Semente	Solo			
	Folhas	Solo					
1	-	-	-	-	8,0 b	3,9 a	10 a
2	-	-	+	-	10,8 a	3,0 b	10 a
3	-	+	+	-	7,3 bc	2,0 c	9 ab
4	-	+	-	+	12,1 a	2,2 c	10a
5	-	+	-	-	6,2 c	0,2 d	6 c
6	+	-	+	-	6,6 bc	0,5 d	8 b

Tratamento 1 (controle): Sementes imersas em caldo amido caseína / Solo sem infestação; tratamento 2: Semente microbiolizada com *Streptomyces* sp. R18(6) / Solo sem infestação; Tratamento 3: Semente microbiolizada com *Streptomyces* R18(6) / Solo infestado com *R. solanacearum*; Tratamento 4: Semente sem tratamento / Solo com *R. solanacearum* e com *Streptomyces* sp. R18(6); Tratamento 5: Semente sem tratamento / Solo com *R. solanacearum*; Tratamento 6: Semente microbiolizada com *Streptomyces* sp. R18(6) / *R. solanacearum* por aspersão.

Resultados com a mesma letra não diferem estatisticamente.

Tabela 2: Altura, peso fresco e número de plantas de tomateiro vivas ao final do experimento inoculadas ou não com *Ralstonia solanacearum* e tratadas ou não com *Streptomyces* R(18(6)), 2ª repetição.

Tratamento	<i>R. solanacearum</i>		<i>Streptomyces</i> R18(6)		Altura	Peso fresco	Nº plantas vivas
	Aspersão	Encharcamento	Semente	Solo			
	Folhas	Solo					
1	-	-	-	-	21,4 a	7,2 a	10 a
2	-	-	+	-	17,3 bc	3,9 c	10 a
3	-	+	+	-	16,4 c	3,8 c	10 a
4	-	+	-	+	18,5 b	5,4 b	10 a
5	-	+	-	-	3,8 e	0,2 e	4 c
6	+	-	+	-	13,5 d	2,3 d	7 b

Tratamento 1 (controle): Sementes imersas em caldo amido caseína / Solo sem infestação; tratamento 2: Semente microbiolizada com *Streptomyces* sp. R18(6) / Solo sem infestação; Tratamento 3: Semente microbiolizada com *Streptomyces* sp. R18(6) / Solo infestado com *R. solanacearum*; Tratamento 4: Semente sem tratamento / Solo com *R. solanacearum* e com *Streptomyces* sp. R18(6); Tratamento 5: Semente sem tratamento / Solo com *R. solanacearum*; Tratamento 6: Semente microbiolizada com *Streptomyces* sp. R18(6) / *R. solanacearum* por aspersão.

Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente

Tabela 3: Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Streptomyces* sp. R18(6) e *R. solanacearum* no solo após o término dos experimentos.

Tratamento	UFC/g de solo	
	<i>Streptomyces</i> R18(6)	<i>R. solanacearum</i>
2	$6,7 \times 10^5$	-
3	$6,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
4	$2,3 \times 10^6$	$3,3 \times 10^5$
5	-	$6,2 \times 10^5$
6	$1,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$



Figura 1: Representa as diferenças entre os tratamentos 1 (T1), 4 (T4) e 5 (T5), onde: T1 - Sementes imersas em caldo amido caseína / Solo sem infestação); T4 - Tratamento 4: Semente sem tratamento / Solo com *R. solanacearum* e com *Streptomyces* R18(6); T5 - Semente sem tratamento / Solo com *R. solanacearum*.

3. DISCUSSÃO

3.1. Isolamento dos actinomicetos

Considera-se endofítico aquele microrganismo que pode ser isolado do interior de uma planta saudável. As bactérias endofíticas isoladas de diferentes plantações compreendem mais de 129 espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas distribuídas em mais de 54 gêneros (Pullen et al., 2002).

Os actinomicetos estão entre os endofíticos mais promissores para a descoberta de novos compostos, e isto se deve, principalmente, à diversidade metabólica apresentada por este grupo de microrganismos. Os metabólitos produzidos pelos actinomicetos endofíticos têm sido empregados em vários campos incluindo: agricultura, veterinária e indústria farmacêutica. Além isto, o micélio e, principalmente, os esporos destes microrganismos têm sido empregados para o controle biológico de fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas.

Castillo *et al.* (2002), observaram que antibiótico munumbicina, produzido por *Streptomyces* endofítico isolado de *Kennedia nigrican*, foi ativo contra bactérias patogênicas de humanos (*S. aureus*, *Bacillus anthracis*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *M. tuberculosis*), fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporium*, *Botrytis alli*, *Alternaria helianthi*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Penicillium* sp., *Sclerotinia sclarerotiorum*, *Erwinia corotovora* e *Cochliobolus*) e contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, agente da malária. Mycostop, biofungicida comercial baseado no *Streptomyces griseoviridis* K61, pode controlar ou suprimir algumas doenças da podridão das raízes ou murcha, causadas por *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. e *Phytophthora* (Minuto et al., 2006).

Devido ao grande potencial de aplicação que este grupo de bactérias apresenta, que actinomicetos endofíticos de tomateiro foram isolados com o objetivo geral de selecionar microrganismos que apresentassem atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias de importância clínica e agrônômica.

Os actinomicetos endofíticos foram isolados de raízes saudáveis de tomateiro. As raízes foram coletadas de plantações residenciais localizadas nas cidades gaúchas de Canoas, Novo Hamburgo e Nova Petrópolis. Para a desinfecção da superfície das raízes foram empregados três protocolos.

O primeiro tratamento empregado (etanol 70% por 5 minutos mais hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos) não eliminou os microrganismos epifíticos,

pois após 24 horas de incubação das placas inoculadas com a 3ª água de enxágüe houve crescimento de microrganismos, principalmente *Bacillus* sp. Este resultado diferiu daquele encontrado por Cao et al. (2004), estes autores trabalharam com raízes de tomateiro e empregaram protocolo de desinfecção semelhante ao acima descrito, porém não tiveram crescimento de microrganismos epifíticos. No entanto, Taechowisan et al. (2003), constataram o crescimento de microrganismos epifíticos, principalmente do gênero *Bacillus*, e sugeriram que este crescimento deve ter sido decorrente de esporos resistentes à desinfecção, presentes na superfície do tecido.

O segundo tratamento utilizado (etanol 70% por 5 minutos, seguido de hipoclorito de sódio 5%, por 10, 15 e 20 minutos) não foi adequado, pois matou tanto os microrganismos epifíticos quanto os endofíticos. Não ocorreu crescimento na água de enxágüe e nem nos meios de cultura onde as raízes foram inoculadas. Este resultado pode ter sido devido ao fato que protocolo foi adaptado de um utilizado no processo de desinfecção empregado para mandioca (EMBRAPA, 2006), a qual possui paredes bem mais espessas do que o tomateiro.

O terceiro tratamento empregado (etanol 70% por 5 minutos mais hipoclorito de sódio 2,5% por 10 minutos) foi o mais adequado, visto que eliminou somente os microrganismos epifíticos. Este foi adaptado a partir dos resultados obtidos com os tratamentos anteriores.

No total foram isolados 70 actinomicetos e estes foram considerados endofíticos de tomateiro, visto que não ocorreu crescimento de microrganismos em nenhum dos dois testes utilizados para validar o protocolo de desinfecção.

3.2. Caracterização dos actinomicetos endofíticos em nível de gênero

Todos os actinomicetos isolados foram caracterizados em nível de gênero através da análise das características morfológicas e testes moleculares. A identificação iniciou com a coloração de Gram, para verificar a pureza da cultura e a forma predominante, filamentososa ou fragmentada em bacilos ou cocos.

Posteriormente, a caracterização prosseguiu com a realização do microcultivo das amostras. Foi empregado o protocolo descrito por Stanley et al. (1999). Esta técnica permite a observação de várias características morfológicas, tais como: ramificação do micélio vegetativo, formação de micélio aéreo e sua fragmentação ou produção de esporos. Nos actinomicetos formadores de esporos pode-se observar a organização dos mesmos (Oliveira, 2003).

As características morfológicas permitiram a caracterização dos actinomicetos em quatro gêneros. O predominante foi *Streptomyces* sp. *Microbispora* sp., *Micromonospora* sp. e *Nocardia* sp.

Os estreptomicetos caracterizaram-se pela presença de um micélio aéreo bem desenvolvido, com longas cadeias de esporos. As cadeias observadas

eram em espirais, flexíveis e “reticulum apertum”. *Microbispora* caracterizou-se pela presença de esporângios aéreos aos pares. *Micromonospora* caracterizou-se pela ausência de micélio aéreo. A maioria das nocardias apresentou micélio aéreo não tão desenvolvido como o dos estreptomicetos e um micélio vegetativo ramificado e fragmentado.

As características de coloração do micélio aéreo e do micélio vegetativo foram utilizados para auxiliar a identificação. Os isolados foram categorizados em grupos de acordo com a cor do micélio aéreo (Williams et al. 1983). Os *Streptomyces* foram categorizados em quatro grupos diferentes (cinza, branco, amarelo e marrom), *Microbispora*, três grupos (cinza, branco e amarelo) e *Nocardia*, dois (branco e amarelo). *Micromonospora* não formou micélio aéreo, mas o micélio vegetativo caracterizou-se por possuir pigmentação laranja. *Streptomyces* com micélio aéreo cinza foi o predominante (44,29%) seguido por *Streptomyces* com micélio amarelo (27,14%).

Para confirmar os resultados encontrados com a análise das características morfológicas foi empregada a Reação em Cadeia da Polimerase. Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores. O primeiro par, F243:5'GGATGAGCCCGCGGCCTA3' e R513: 5'CGGCCGCGGCTGCTGGCAC GTA3', foi utilizado para confirmar a ordem Actinomycetales, seguiu as condições de amplificação utilizadas por Oliveira (2003). O segundo par utilizado, desenhado por Rintala et al. (2004), foi específico para o gênero *Streptomyces* (StrepB:

5'ACAAGCCCTGGAAACGGGGT3' e StrepF: 5'ACGTGTGCAGCCCAAG ACA 3'), empregou-se as condições de amplificação descritas por Rintala et al. (2001).

Todos os isolados amplificaram com o par de oligonucleotídeos iniciadores F243/R513, produzindo um fragmento de 302 pares de base. Este resultado está em conformidade com o obtido através das características morfológicas, ou seja, todos eram actinomicetos. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2001) e Dees & Ghiorse (2001), os quais conseguiram amplificar especificamente a região 16S DNAr dos actinomicetos empregando este par de oligonucleotídeos iniciadores.

Quando o par de oligonucleotídeos iniciadores StreP-StrepF foi utilizado, somente os isolados caracterizados inicialmente com pertencentes ao gênero *Streptomyces* sp., amplificaram. Este resultado já era esperado, visto que este par de oligonucleotídeos iniciadores foi descrito como específico para a detecção do gênero *Streptomyces* sp. (Rintala et al., 2004; Rintala et al., 2001).

Streptomyces sp. foi o gênero predominante neste trabalho. Actinomicetos já foram isolados de diferentes espécies de plantas, tais como: *Azadirachta indica* (Verna et al., 2009), banana (Cao et al., 2005), tomate (Cao et al., 2004), em todos estes estudos ocorreu o predomínio de *Streptomyces* sp.. Este predomínio pode estar relacionado com a grande diversidade metabólica que estas bactérias apresentam.

3.3. Avaliação do potencial antimicrobiano

3.3.1. Potencial antimicrobiano contra microrganismos clinicamente importantes

Após a caracterização dos actinomicetos em nível de gênero, o trabalho prosseguiu com a avaliação do potencial antimicrobiano destes microrganismos. O mesmo se deu contra microrganismos de importância clínica e também contra fitopatógenos.

A seleção de actinomicetos com atividade antimicrobiana contra microrganismos clinicamente importantes foi realizada devido à necessidade de se encontrar microrganismos com potencial para produzir novos compostos bioativos.

A atividade antimicrobiana dos 70 actinomicetos isolados foi avaliada empregando a técnica da dupla camada. Foram utilizadas 19 bactérias Gram-positivas, 12 Gram-negativas, cinco leveduras e três fungos filamentosos.

Dos 70 actinomicetos isolados, 61 (87.1%) inibiram pelo menos um microrganismo teste. Destes, 51 (83.6%), 36 (59.0%) e 32 (52.5%) foram ativos, respectivamente, contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

As bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis do que as Gram-negativas, o percentual de inibição foi, respectivamente, 37 (72.6%) e 4 (7.8%). Este resultado está de acordo com o encontrado por Thakur et al. (2007). Este fato pode estar relacionado com as diferenças na constituição da parede celular destes dois grupos de bactérias. Apesar da atividade antimicrobiana contra as

bactérias Gram-negativas ter sido menor, mostrou-se relevante pois, inibiu bactérias representantes da família *Enterobacteriaceae*, tais como *E. coli* e *Klebsiella* sp.. Tais microrganismos são reportados como causadores de infecções do trato urinário, infecções sanguíneas, pneumonias e várias infecções intra-abdominais. Além disto, estes microrganismos vêm apresentando índices crescentes de resistência a cefalosporinas de terceira geração, quinolonas e carbapenem.

Os actinomicetos apresentaram potencial para inibir as leveduras e fungos filamentosos empregados neste estudo. Como estes microrganismos foram isolados de tomateiros da região sul do Brasil, uma área ainda pouco explorada, há a possibilidade de se isolar um composto antifúngico novo. Fato este que acarretaria vantagens para a medicina, pois, além dos problemas relacionados com a resistência a compostos antifúngicos ainda há, os problemas relacionados com a toxidez apresentada pela maioria destes compostos. Segundo Gupte et al. (2002) a anfotericina B aplicada no tratamento de infecções causadas por *Blastomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* e *Histoplasma* causa nefrotoxicidade, redução do fluxo de sangue renal, náuseas, vômito e anorexia. Nistatina, aplicada para candidíase também é tóxica em uso sistêmico. Griseofulvina causa hepatotoxicidade e dores abdominais.

O isolado R18(6), destacou-se por inibir todos fungos filamentosos e leveduras e 81,3% das bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à

meticilina e *Salmonella Enteritidis* SE86. Esta cepa de *Salmonella* foi isolada de surtos de salmonellose ocorridos na região sul do Brasil e apresenta resistência a múltiplos antibióticos.

O fato do isolado R18(6) ter apresentado amplo espectro de ação e microrganismos em Domínios diferentes pode-se inferir a possibilidade deste produzir mais de um composto com atividade antimicrobiana. Entretanto, compostos antimicrobianos com capacidade de inibir grupos distintos de microrganismos já foram reportados, como exemplos pode-se citar a kakadumicina (Strobel & Daisy, 2003) e coronamicina (Zhang et al., 2006).

A maioria dos actinomicetos apresentou um espectro antibacteriano limitado, inibindo, em média, cinco bactérias teste. Entretanto, podem ser promissores, pois, inibiram microrganismos clinicamente importantes tais como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp. e *Candida* sp.. *P. aeruginosa*, vem apresentando crescente aumento no padrão de resistência a múltiplos antimicrobianos. *Enterococcus* apresentam resistência intrínseca a vários antimicrobianos. *Candida* vem apresentado índices crescentes de resistência (Saadoun & Al-Momani, 2000).

Os *Streptomyces* com micélio aéreo cinza destacaram-se por ser o grupo com o maior percentual de antagonistas (%). Entretanto, os *Streptomyces* com micélio aéreo amarelo foram os que apresentaram um amplo espectro de ação, 61,5% desses isolados inibiram bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

Apesar de *Streptomyces* ter sido o gênero predominante, é importante salientar a importância dos demais gêneros isolados. Todas as nocardias, micromonosporas e microbisporas isoladas neste trabalho foram ativas, no mínimo, contra um microrganismo teste. *Nocardia* isolada por Verma et al. (2009) apresentou atividade antagônica contra potenciais patógenos humanos, incluindo *Candida albicans*, *Trichophyton*, *Microsporium* e *Aspergillus*. Estudos com outros gêneros de actinomicetos, além dos *Streptomyces*, podem ter resultados promissores podendo culminar no isolamento de um composto bioativo novo.

3.3.2. Otimização das condições de produção do(s) composto(s) com atividade antimicrobiana

Dois actinomicetos com um bom espectro de ação foram selecionados e utilizados para otimizar as condições de produção do(s) composto(s) com atividade antimicrobiana através da técnica difusão em ágar pelo sistema de pocinhos (Thakur, et al., 2007). Os dois isolados R3(1) e o BIO3 foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

Para a otimização foram empregados cinco meios de cultura, três temperaturas e cinco microrganismos teste (quatro bactérias e uma levedura). Pode-se verificar que a temperatura e a composição do meio foram determinantes para a produção do(s) composto(s) com atividade antimicrobiana, visto que os isolados cresceram em todas as temperaturas e meios empregados, porém

somente apresentaram atividade antimicrobiana em determinadas condições. Os *Streptomyces* Bio3 e R3(1) apresentaram os maiores halos de inibição nos meios de cultura amido caseína e ISP2, respectivamente nas temperaturas de 30 e 35°C. Sendo a temperatura ótima 30°C para a produção dos metabólitos. Segundo Ouhdouch et al. (2001), a temperatura adequada para o crescimento não é sempre a mesma utilizada para a produção. Os valores ótimos para a produção possuem uma faixa de variação, normalmente, restrita e em torno de 5°C. Enquanto, que a variação de temperatura para o crescimento é mais ampla.

Segundo Thakur et al. (2009) a produtividade antibiótica tem tendência a diminuir quando meio é deficiente em íons metais e quando o inóculo é incubado por longos períodos em altas temperaturas. No seu estudo foi verificado que o *Streptomyces* sp 201 apresentou crescimento micelial máximo a 35°C, entretanto a produção de metabólito bioativo foi maior a 30°C.

O tipo de fonte de carbono e nitrogênio, temperatura pH e tempo de incubação fortemente afetam a produção de metabólitos em diferentes microrganismos. No trabalho realizado por Laidi et al., (2008), a produção de antibiótico pelo *Streptomyces* SK4-6 foi afetado positivamente pelo amido, mas foi afetada negativamente pela sacarose, sulfato de amônia e extrato de levedura .

Uma diferença foi observada nos resultados encontrados quando os dois isolados cresceram em meio sólido (dupla camada) e em cultura submersa (para o teste de difusão). *Escherichia coli* foi inibida pelo isolado R3(1) no teste da

dupla camada, mas não foi inibida no teste de difusão. Estas diferenças podem estar relacionadas com o tipo e o tamanho da molécula que está sendo produzida. Segundo Nkanga and Hagedorn (1978), o tamanho da zona de inibição é dependente da taxa de difusão do antibiótico e a produção de antibióticos em cultura líquida é usualmente baixa e os compostos precisam ser concentrados para serem detectados. Além disto, em cultura líquida o antibiótico pode sofrer lise enzimática, ficando em menor quantidade, enquanto que na sobrecamada, o antibiótico é continuamente difundido no meio de cultura e então a inibição do estreptomiceto ou degradação do agente antimicrobiano é evitada (Nkanga & Hagedorn, 1978).

Os resultados obtidos sugerem que vários microrganismos analisados neste estudo apresentam potencial biotecnológico para a produção de compostos bioativos contra microrganismos clinicamente importantes.

3.3.3. Potencial antimicrobiano contra fitopatógenos

A aplicação de agrotóxicos ainda é a medida de controle de fitofatógenos mais utilizada na agricultura. Entretanto, esta prática além de elevar os custos da produção, também acarreta sérios problemas ao meio ambiente.

Agrotóxicos podem: contaminar o solo e a água, causar desequilíbrio ecológico atuando sobre organismo não alvo e selecionando fitopatógenos resistentes, intoxicar animais e o homem.

O tomate está entre as culturas que mais recebe aplicações de agrotóxicos. Esta cultura é bastante suscetível a fitopatógenos, mais de duzentos já foram reportados (Filho et al., 2008). O número elevado de aplicações de agrotóxicos nesta cultura, além de ocasionar danos ambientais também coloca em risco à saúde dos agricultores, devido à exposição contínua a esse tipo de produto, e dos consumidores.

Devido a este fato formas alternativas de controle de fitopatógenos estão sendo propostas, entre estas se destaca o emprego de agentes de biocontrole empregando fungos e bactérias. Entre estas, os actinomicetos têm apresentado potencial e trabalhos empregando estes microrganismos têm-se mostrado eficientes.

Actinoplanes campanulatus, *Micromonospora chalcea* e *Streptomyces spiralis*, endofíticos de pepino, suprimiram a doença causada por *P. aphanodermatum* quando aplicados individualmente ou em conjunto e reduziram significativamente o tombamento, podridão da coroa e da raiz sob condições de casa de vegetação (El-Tarabily et al., 2009). Zin et al. (2007) isolou três estreptomicetos endofíticos de plantas da Península da Malay. Estes foram letais contra fungos fitopatogênicos tais como: *Mycosphaerella fijiensis*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rizoctonia solani* e *Phytophthora erythroseptica*. Cinco actinomicetos endofíticos isolados de pepino e um isolado de abóbora

impediram o desenvolvimento da doença sobre os cotilédones e folhas de pepino causado por *Colletotrichum orbiculare* (Shimuzu, et al., 2009).

O potencial antimicrobiano dos 70 actinomicetos isolados foi avaliado empregando bactérias e fungos fitopatogênicos. Também foi determinada a produção de sideróforos, ácido indol acético, enzimas extracelulares e a solubilização de fosfato destes isolados.

Todos os gêneros de actinomicetos isolados neste trabalho, demonstraram possuir potencial para agentes de biocontrole. Este potencial pode ser verificado através da atividade antimicrobiana no teste de antibiose, pela produção de enzimas, ácido indol acético e sideróforos e também pela capacidade de solubilizar fosfato. Dos 70 actinomicetos analisados, 88,57% apresentaram atividade contra pelo menos um fitopatógeno. A capacidade antagonista dos actinomicetos endofíticos é bem estabelecida e já foi reportada em estudos anteriores (Verma et al., 2009; Minuto et al., 2006; Valois et al., 1996) e também em aplicação em formulações de uso comercial como nos produtos Mycostop, Actinovate e Actinolron (Hamdali et al., 2008).

No presente estudo o percentual de *Streptomyces* que apresentou atividade antimicrobiana foi elevado (89,0%). Os *Streptomyces* com micélio aéreo amarelo foram os que apresentaram maior espectro de ação, resultado semelhante ao encontrado contra os microrganismos clinicamente importantes. Dos 33 actinomicetos que inibiram bactérias e fungos fitopatogênicos, 15 isolados

pertenciam ao grupo de *Streptomyces* com micélio aéreo amarelo. Os gêneros *Microbispora*, *Micromonospora* e *Nocardia* também apresentaram atividade antibacteriana inibiram, respectivamente, 88,9%, 100% e 100% das bactérias fitopatogênicas, mostrando que a diversidade de produtos bioativos também pode ser muito importante em isolados de outros gêneros que não estreptomicetos. Trabalhos realizados por Hasegawa et al. (2006) e Hamdali et al. (2008) relataram a ação de biocontrole do gênero *Micromonospora* contra, respectivamente, *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici* e *Pythium ultimum*. *Nocardia* AzL025. *Micromonospora* isolada por Verma et al. (2009), mostrou forte inibição contra *Pythium oligandrum*.

O percentual de actinomicetos que apresentou atividade positiva para a produção de sideróforos foi elevada (86,8%). A produção de sideróforos pode ser vantajosa para o agente de biocontrole, visto que é empregada como um mecanismo de controle de fitopatógenos, principalmente em ambientes onde o ferro é fator limitante. Usualmente, sideróforos são produzidos por vários microrganismos do solo, eles ligam Fe^{3+} do ambiente, transportam para a célula microbiana e o tornam disponíveis para o crescimento. Sideróforos microbianos podem ser também utilizados pela planta como fonte de ferro. Competição por ferro é também um possível mecanismo para controle de fitopatógenos. Sideróforos são produzidos por vários microrganismos do solo para ligar Fe^{3+} do ambiente, transportá-lo para célula microbiana e torná-lo disponível para o

crescimento. Sideróforos microbianos também podem ser utilizados pelas plantas como uma fonte de ferro. Competição por ferro também é um possível mecanismo para o controle de fitopatógenos (Khamna et al., 2009).

A produção de ácido indol acético e solubilização de fosfato foi positiva para 72,1%, 16,2% dos isolados respectivamente. Estes dois mecanismos estão envolvidos, principalmente, com a promoção de crescimento da planta. No trabalho realizado por Hamdali et al. (2008), *Micromonospora aurantica* e *Streptomyces griseus* foram capazes de tornar o fósforo, naturalmente presente no solo, disponível para a planta, o que acarretou no aumento do peso seco dos brotos e das raízes de trigo. Apesar de importante, a solubilização de fosfato tem sido verificada num número reduzido de microrganismos. Hameeda et al (2008), encontrou poucos isolados positivos para solubilização do fosfato, somente cinco, dos 207 isolados, foram positivos.

As enzimas produzidas pelo maior número de isolados foram: celulase (87,2%) e esterase (87,2%). A alta incidência de isolados produtores de destas enzimas pode estar relacionada com o fato dos microrganismos serem endofíticos e estes substratos empregados fazerem parte da constituição da parede celular da planta. A produção destas enzimas é importante para os potenciais agentes de biocontrole, pois podem favorecer a penetração dos mesmos nos tecidos internos da planta.

3.3.4. Otimização das condições de produção do(s) composto(s) com atividade antifitopatogênica

O isolado R18(6) foi o actinomiceto que apresentou o melhor potencial de inibição de microrganismos fitopatogênicos nos testes de antibiose, pois inibiu o maior número de fitopatógenos. Por este motivo foi escolhido para otimizar as condições de produção. Foram utilizados seis meios de cultura e três temperaturas. O caldo AC, selecionado, foi avaliados os pHs de 4 a 12. O isolado cresceu em todos os meios de cultura, todas as temperaturas e pH testados. Entretanto a melhor atividade antimicrobiana foi observada a quando o crescimento se deu em caldo amido caseína, temperatura de 30°C e pH 7. O isolado R18(6), quando cultivado em cultura submersa, não inibiu *P. carotovorum* pv. *brasiliensis*, que havia sido inibido em meio de cultura sólido. Resultado semelhante foi observado para os isolados R3(1) e Bio3.

3.4. Caracterização do isolado R18(6)

O isolado R18(6) destacou-se como sendo o isolado com o melhor potencial antimicrobiano, inibiu o maior número de microrganismos nos testes de antibiose. Este isolado foi eficiente para inibir tanto microrganismos de interesse clínico e como fitopatogênicos. Este isolado foi, inicialmente, caracterizado como pertencente ao gênero *Streptomyces* sp. Este resultado foi obtido através da análise das características morfológicas e moleculares discutidas anteriormente.

A caracterização de estreptomicetos em nível de espécie é complexa e envolve a análise de parâmetros morfológicos, bioquímicos e moleculares. Portanto, a caracterização do isolado prosseguiu com a observação da estrutura da superfície dos esporos através da microscopia eletrônica de varredura, realização de testes bioquímicos e seqüenciamento da região 16S do DNAr.

Segundo Rabah et al. (2007), a caracterização de espécies de *Streptomyces* baseia-se, principalmente, na cor do micélio aéreo e sobre o substrato e dos pigmentos solúveis, a forma e ornamentação da superfície dos esporos, por causa da estabilidade. Além disto, para a identificação adequada algumas características fisiológicas tais como variação da temperatura de crescimento, degradação de amido, gelatina, inositol e ramnose e redução de nitrato, alguns testes adicionais relativo ao uso de arabinose, glicerol, galactose e manitol são também considerados para averiguar a classificação de novos isolados.

Regiões dentro da região 16S RNA podem ser utilizadas para auxiliar a identificação em nível de gênero e espécie. Variações nas regiões α e β podem ser úteis para caracterização do gênero, enquanto a região γ proporciona caracterização das espécies de *Streptomyces* (Anderson & Wellington, 2001). Os resultados baseado nas análises realizadas sugere que R18(6) seja identificado como *Streptomyces rochei*. O percentual de similaridade encontrado com esta espécie através da análise do 16S DNAr foi de 97%, as características

morfológicas foram iguais as relatadas para esta espécie e os resultados dos testes bioquímicos foram bastante semelhantes, ocorreu divergências somente para o metabolismo da valina, rafinose e sacarose. Segundo Shimizu et al. (2004) algumas pequenas diferenças nas características fisiológicas podem ser permitidas para a identificação de espécies. Os autores verificaram que na pesquisa realizada no BLAST, a sequência 16S DNAr do isolado R-5 apresentou 98,48% de homologia com *Streptomyces galbus*. Características fisiológicas, morfológicas e culturais do isolado foram comparadas com *S. galbus*, sendo quase todas consistentes, exceto a utilização de inusitol e descoloração de pigmentos difusíveis pela mudanças de pH. Os autores consideram o isolado R-5 como sendo *S. galbus*.

O amplo espectro antimicrobiano de um isolado de *Streptomyces rochei* também foi relatado por Kavitha & Vijayalakshmi (2007). *Streptomyces rochei* MTCC8376 isolado de amostras de solo apresentou forte atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e negativas, fungos filamentosos e leveduras.

3.5. Avaliação do potencial de biocontrole do *Streptomyces* R18(6) contra *Ralstonia solanacearum* em condições da casa de vegetação

Ralstonia solanacearum é uma importante bactéria do solo com distribuição mundial e uma ampla variedade de hospedeiros, com mais de 200 espécies em

50 famílias. *R. solanacearum* invade os vasos do xilema das raízes e dissemina-se no caule onde multiplica-se e provoca a murcha pela excessiva produção de exopolissacarídeos (Thanh et al., 2009). Os danos ocasionados, por esta bactéria à cultura do tomate podem ser totais e medidas de controle são pouco eficazes.

Estudos com actinomicetos como agentes de biocontrole da murcha bacteriana têm apresentado resultados satisfatórios, principalmente *in vivo*. Entretanto, estes resultados nem sempre se repetem em condições em casa de vegetação ou no campo.

O isolado R18(6), actinomiceto que nos testes de antibiose inibiu diferentes microrganismos fitopatogênicos, entre eles *R. solanacearum* foi selecionado para avaliar a sua eficiência no controle da murcha bacteriana em condições de casa de vegetação. Também foi averiguada a capacidade do actinomiceto colonizar as sementes de tomateiro *in vitro* e o potencial enzimático.

O experimento foi mantido em casa de vegetação por um período de 45 dias. Foi utilizado um controle (sementes sem tratamento e solo sem *R. solanacearum*) e diferentes combinações de tratamento, sementes com e sem microbiolozação pelo actinomiceto e solo infestado ou não com a bactéria.

O isolado R18(6) demonstrou habilidade para colonizar as sementes de tomateiro no teste *in vitro* utilizando o ágar-água. O crescimento do microrganismo foi evidenciado através do aparecimento de uma zona turva ao redor da radícula. Como o meio utilizado não contém nutrientes capazes de

sustentar o crescimento do isolado, assumiu-se que o mesmo ocorreu devido à metabolização dos exsudatos produzidos pela raiz do tomateiro. Segundo Silva et al. (2003), o ágar-água sozinho usualmente não suporta o crescimento da maioria dos procariotos a menos que exsudatos das raízes exerçam quimiotaxia positiva, proporcionando nutrientes para o crescimento bacteriano.

O experimento realizado na casa de vegetação demonstrou que o isolado apresenta potencial para controlar a murcha bacteriana em condições controladas. Observou-se um número maior de plantas mortas e com sintomas da murcha bacteriana no tratamento sem a presença do antagonista. Enquanto que nos tratamentos onde isolado R18(6) esteve presente, tanto nas sementes como no solo, as plantas apresentaram-se saudáveis.

Moura et al. (1998) também determinaram a ocorrência de actinomicetos com alto potencial para o controle de *R. solanacearum* em tomateiro. Os autores observaram que melhores resultados foram obtidos quando os antagonistas estavam veiculados pelas sementes. Gava et al. (2002) observaram que *Streptomyces* SG384 protegeu o tomateiro contra *R. solanacearum*. Apenas 35% de plantas tratadas com o isolado foram infectadas no 48º dia após o transplante, enquanto que nos demais isolados testados a porcentagem de infecção foi superior a 80%.

O antagonista também demonstrou influenciar positivamente o crescimento das plantas de tomateiro, pois foi possível observar um aumento na

altura da parte aérea das plantas e também do peso fresco das plantas nos tratamentos onde o actinomiceto foi introduzido. Este aumento foi mais acentuado no primeiro experimento, onde o microrganismo pode ter atuado de forma mais intensa disponibilizando nutrientes para as plantas. No primeiro experimento as plantas foram molhadas somente com água.

O isolado R18(6) também apresentou bom potencial enzimático, produzindo amilase, celulase, proteínase, lipase e pectinase. Algumas destas enzimas, celulase e pectinase, podem ser utilizadas para favorecer a colonização das raízes pelo microrganismo, mas também podem servir como um mecanismo de biocontrole. Microrganismo antagonista pode utilizá-las para degradar a parede celular do fitopatógeno. Microrganismos que apresentam bom aparato enzimático podem ser favorecidos, principalmente quando o ambiente é competitivo, podendo se estabelecer com maior facilidade do que os demais, o que é bastante importante para um agente de biocontrole.

Segundo Vasconcellos & Cardosos (2009), os actinomicetos são microrganismos que tem uma capacidade especial de sobreviver em ambiente competitivo, principalmente devido à produção de antibióticos, enzimas como xilanase, lipase, pectinase, amilase, quitinase, e também devido aos seus eficientes mecanismos de dispersão. Actinobacteria participam na degradação de substâncias complexas tais como lignocelulose, lignina e celulose. Portanto, eles têm uma melhor chance de se estabelecer e multiplicar na maioria dos locais

onde são introduzidos. Um microrganismo para ser um bom agente de biocontrole precisa produzir alguma substância inibitória contra o patógeno, mas também precisa se estabelecer e manter alta a população.

Os resultados indicam que o isolado R18(6) apresenta potencial como agente de biocontrole da murcha bacteriana. Entretanto, testes em condições de campo devem ser realizados.

3.6. Referências Bibliográficas

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

CAO, L. et al. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.247, n.5, p.147-152, 2005.

CAO, L. et al. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v.39, p.425-430, 2004.

CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M.A.M.; TELOW, D.B.; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, Spencers Wood, v.148, p.2675-2685, 2002.

DEES, P.M.; GHIORSE, W.C. Microbial diversity in hot syntetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.35, n.2, p.207-216, 2001.

EL-TARABILY, K.A. et al. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.106, n.1, p.13-26, 2009.

EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/projetos/endofiticos/materiais.html>>. Acesso em: 2 jan 2006.

FGUIRA, L.F. et al. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. Strain US80. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.156, n.3, p.341-34, 2005.

FIGUEIREDO, E.A.P. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v.19, n.4, p.421-427, 2007.

FILHO, R.C.; ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O. Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophiliscinus*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, n.6, p.457-460, 2008.

GAVA, C.A.T. et al. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.10, p.1373-1380, 2002.

GUPTA, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B.N. Antifungal antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v.58, n.1, p.46-57, 2002.

HAMDALI, H. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient under greenhouse conditions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.40, n.3, p.510-517, 2008.

HASEGAWA, S. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. **Actinomycetologia**, Washington, v.20, n.2, p.72-81, 2006.

LAI, R.F. et al. A new actinomycete strain SK4-6 producing secondary metabolite effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.24, n.10, p.2235-2241, 2008.

MINUTO, A. et al. Control of soilborne pathogens to tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. **Crop Protection**, Oxford, v.25, n.5, p.468-475, 2006.

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S.; NEVES, M.C.P. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.3, n.12, p.2065-2072, 1998.

NKANGA, E.; HAGEDORN, C. Detection of antibiotic-producing *Streptomyces* inhabiting forest soils. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.14, n.1, p.51-59, 1978.

OLIVEIRA, M.F. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. 2003. 125f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2003.

OSKAY, M.; TAMER, A.U.; AZERI, C. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. **African Journal of Biotechnology**, Washington, v.3, n.9, p.441-446, 2004.

OUHDOUCH, Y.; BARAKATE M.; FINANCEI. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. **European Journal Soil Biology**, Oxford, v.37, n.2, p.69-74, 2001.

PATERSON, D.L. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **American Journal of Medicine**, New York, v.119, p.S20-S28, 2006.

PULLEN, C.; et al. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of *Celastraceae*. **Planta**, Berlin, v.216, n.1, p.162-167, 2002.

RABAH, F.L. et al. Screening, isolation and characterization of a novel antimicrobial producing actinomycete, strain RAF10. **Biotechnology**, Faisalabad, v.6, n.4, p.489-496, 2007.

RINTALA, H et al. Detection of streptomyces in house dust – comparison of culture and PCR methods. **Indoor air**, Santa Cruz, v.14, n.2, p.112-119, 2004.

RINTALA, H.; NEVALAINEN, A.; RÖNKA, E. PCR primers targeting the 16S rDNA gene for specific detection of streptomyces. **Molecular and Cellular Probes**, v.15, p.337-347, 2001.

SHIMIZU, M., YAZAWA, S., USHIJIMA, Y. A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.75, n.1, p.27-36, 2009.

SHIMIZU, M. et al. Identification of endophytic *Streptomyces* sp. R-5 and analysis of its antimicrobial metabolites. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.70, n.1, p.66-68, 2004.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.151, n.1, p.42-46, 2003.

SIMONSEN, G.S. et al. Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v51, p.323-331, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.67, n.4, p.491-502, 2003.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology & biotechnology**, Oxford, v.19, n.4, p.381-385, 2003.

THAKUR, D. et al. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v.19, n.3, p.161-167, 2009.

THAKUR, D. et al. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v.17, n.4, p.242-249, 2007.

THANH, D.T. et al. Biological control of soilborne diseases on tomato, potato and black pepper by selected PGPR in the greenhouse and field in Vietnam. **Plant Pathology Journal**, Bari, v.25, n.3, p.263-269, 2009.

VALOIS, D. et al. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.5, p.1630-1635, 1996.

VASCONCELLOS, R.L.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Rhizospheric streptomycetes potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. **Biocontrol**, Dordrecht, v.54, n.6, p.807-816, 2009.

VERMA, V.C. et al. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, diversity, and anti-microbial activity. **Microbiological Ecology**. New York, n.4, v.57, p.749-756, 2009.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**, Cambridge, v.23, n. p.753-771, 2006.

ZIN, N.M. et al. Bioactive endophytic streptomycetes from the Malay Peninsula. **FEMS Microbiology Letters, Amsterdam**, v.274, n.1, p.83-88, 2007.

WILLIAMS, S.T. et al. A probability matrix for identification of some Streptomycetes. **Journal of General Microbiology**, Tokyo, v.129, p.1815-1830, 1983b.

4. CONCLUSÕES

1. *Streptomyces* é o gênero predominante, de actinomiceto endofítico de tomateiro, isolado neste trabalho.
2. Os actinomicetos apresentam potencial antimicrobiano contra os microrganismos de importância clínica e contra os fitopatógenos.
3. *Streptomyces* sp. com micélio aéreo amarelo são os que apresentam maior espectro de ação.
4. O isolado *Streptomyces* R18(6) é o que apresenta melhor potencial antimicrobiano contra os microrganismos de importância clínica e fitopatógenos.
5. O isolado *Streptomyces* R18(6) demonstra ser um potencial agente de biocontrole.

Vita

Margaroni Fialho de Oliveira, natural de Santana do Livramento, ingressou no curso de Biologia, Licenciatura Plena e Bacharelado, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – RS, em 1995. Foi bolsista de iniciação científica no período de 1998 a 2000. Graduou-se como bióloga em 2000. Em 2001 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da UFRGS, obtendo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente em 2003.

Foi professora substituta no Departamento de Microbiologia da UFRGS do período de 2004 a 2005.

Em agosto de 2005 ingressou no curso de Doutorado do Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.