

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Bioprospecção de actinobactérias associadas à esponja marinha
Aplysina fulva: isolamento, caracterização e produção de
compostos bioativos**

Fábio Sérgio Paulino da Silva

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Fábio Sérgio Paulino da Silva
Licenciado em Ciências Biológicas

Bioprospeção de actinobactérias associadas à esponja marinha *Aplysina fulva*: isolamento, caracterização e produção de compostos bioativos

Orientador:
Prof. Dr. ITAMAR SOARES DE MELO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Silva, Fábio Sérgio Paulino da

Bioprospecção de actinobactérias associadas à esponja marinha *Aplysina fulva*:
isolamento, caracterização e produção de compostos bioativos / Fábio Sérgio Paulino
da Silva. -- Piracicaba, 2015.
159 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Metabólitos secundários 2. Fungicidas 3. *Pythium aphanidermatum* 4. *Phytophthora capsici* 5. *Magnaporthe grisea* 6. Algicida 7. *Selenastrum capricornutum* 8. Herbicida 9. Pré-emergência 10. *Agrostis stolonifera* 11. Taxonomia polifásica 12. Bioprospecção I. Título

CDD 589.92
S586B

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

*Aos meus pais, aos meus irmãos, à minha
companheira Fabiana, e a todos os amigos que
sempre influenciaram positivamente meu galgar
nesta breve, porém feliz existência.*

There is a strong need for a new and better
management system in the country, especially
in the public sector, to improve the way
business is done, and to

THE NATIONAL UNIVERSITY OF MANAGEMENT
AND BUSINESS ADMINISTRATION

Faculty of Business Administration
Department of Management
Level: Bachelor of Business Administration
Course: Management
Semester: 1st

Topic: Business Ethics and Corporate Social Responsibility

1. Explain the concept of Business Ethics and Corporate Social Responsibility.
2. Discuss the importance of Business Ethics and Corporate Social Responsibility in the
business world.

DATE: / /
PAGE: 1

QUESTION

AGRADECIMENTOS

A DEUS. Palavras não bastam para descrever a imensa gratidão;

Aos meus pais, Flávio e Áurea, por todo amor, dedicação e exemplo de educação, que serviram de pilares para minha existência;

Aos meus irmãos, Bruno e Cássio por todo amor e carinho;

A minha eterna companheira Fabiana pelo amor, carinho e compreensão nesta fase de minha jornada;

Aos meus amigos do peito, George, Marcelo, Jean, Deyvit, Anderson, Tiago, Andre, Gabriel, Franco, Solano e Samuel, por todo o companheirismo, que desde a infância só trazem boas lembranças;

Ao orientador e amigo, Dr. Itamar Soares de Melo pela oportunidade, sugestões, confiança, paciência e ensinamentos;

Aos colegas e grandes amigos que tive o privilégio de conhecer durante os anos de vida acadêmica: Élcio, Ismael, Victor, Marcelo, Robson, Antover, Tirone, Daniela, Sidney, Karine, Éder, Adriano, Rafael Valadares, Elisa, Bruna, Alice, Silvia, Rafael Vasconcellos, Danilo, Camila, Ana Gabriele, Suikinai, Vanessa, Taketani, Tiago, Tatiana, João Luiz, Rafael Silva, Wallace, Rose, Joseane, Ana Paula, Stalin, Mendes, Jorge e Harold;

Aos Professores e amigos que me orientaram desde o início da graduação: Prof. José Antônio Peters, Prof. Marco Antônio Bacarin, Prof^a. Andrea Bittencourt Moura e Prof. Marcos Rogério Tótola;

A Embrapa Meio Ambiente pelo fornecimento do espaço no Laboratório de Microbiologia Ambiental e por todas as condições para realização dos trabalhos;

A Universidade de São Paulo em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' pela oportunidade do doutoramento e por todo apoio que contribuiu para meu crescimento profissional;

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida e pelo apoio financeiro através do projeto Arquipélago e Ilhas Oceânicas – Chamada 39/2012 que viabilizou a elaboração desta tese;

A Marinha do Brasil em especial ao Comandante Carvalho e a Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (SECIRM), que junto ao CNPq, viabilizaram o projeto e a expedição ao Arquipélago de São Pedro e São Paulo;

À Tripulação "safa" do TRANSMAR pela logística e por toda a "faina" de travessia de Natal- RN até o Arquipélago de São Pedro e São Paulo;

Ao apoio do grande amigo Fernando Rodrigues que com sua experiência, auxiliou e conduziu da melhor forma possível todos os mergulhos no Arquipélago;

Aos parceiros do projeto sem os quais seria impossível a realização deste trabalho: Msc. Danilo Tosta Souza, Camila Pansa, Roseli de Cássia de Almeida Pamplona, Jorge Fernandes Albano de Moraes, Dr. Rodrigo Taketani, Dr^a. Sonia Queiroz, Dr. Eduardo Crevelin, Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Dr^a. Suikinai Nobre Santos, Dr. Tiago Domingues Zucchi e Dr. Fernando Coreixas de Moraes.

"A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada."

Albert Einstein

A Comissão de Trabalho, de Meio Ambiente e Previdência Social do Conselho Nacional de Desenvolvimento Humano do Brasil (CNDM) debruçou-se sobre o tema da "Qualidade de Vida" em um seminário de planejamento e gestão em julho de 2001, com o objetivo de estabelecer prioridades.

Após o período de discussão, a comissão selecionou membros para atuar no projeto "Atividade e Vida Saudável" - "Atividade Física" que visava à melhoria da qualidade de vida.

A Comissão de Trabalho, de Meio Ambiente e Previdência Social do Conselho Nacional de Desenvolvimento Humano do Brasil (CNDM) debruçou-se sobre o tema da "Qualidade de Vida" em um seminário de planejamento e gestão em julho de 2001, com o objetivo de estabelecer prioridades. A comissão selecionou membros para atuar no projeto "Atividade e Vida Saudável" - "Atividade Física" que visava à melhoria da qualidade de vida. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a primeira, com o objetivo de identificar as necessidades e a segunda, com o objetivo de estabelecer prioridades. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a primeira, com o objetivo de identificar as necessidades e a segunda, com o objetivo de estabelecer prioridades. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a primeira, com o objetivo de identificar as necessidades e a segunda, com o objetivo de estabelecer prioridades.

Após o período de discussão, a comissão selecionou membros para atuar no projeto "Atividade e Vida Saudável" - "Atividade Física" que visava à melhoria da qualidade de vida. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a primeira, com o objetivo de identificar as necessidades e a segunda, com o objetivo de estabelecer prioridades.

Após o período de discussão, a comissão selecionou membros para atuar no projeto "Atividade e Vida Saudável" - "Atividade Física" que visava à melhoria da qualidade de vida. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a primeira, com o objetivo de identificar as necessidades e a segunda, com o objetivo de estabelecer prioridades. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a primeira, com o objetivo de identificar as necessidades e a segunda, com o objetivo de estabelecer prioridades.

"Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas mudam o mundo"

Paulo Freire

Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas mudam o mundo.

Paulo Freire

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	23
1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo principal.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 A demanda por novos agroquímicos e a importância das Actinobactérias para a agrobiotecnologia.....	29
3.2 Actinobactérias em ambientes marinhos.....	32
3.3 Estratégias de isolamento de actinobactérias marinhas.....	33
3.4 Taxonomia de microorganismos	36
3.5 Esponjas marinhas.....	37
3.6 Associação entre esponjas e microorganismos e o potencial destes na produção de compostos bioativos.....	40
3.7 <i>Aplysina fulva</i> : distribuição, descrição taxonômica e potencial biotecnológico....	43
Referências	45
4 DIVERSIDADE DE ACTINOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE COMPOSTOS FUNGICIDAS ISOLADAS DE <i>APLYSINA FULVA</i> DO ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO.....	53
Resumo	53
Abstract	53
4.1 Introdução	54
4.2 Material e Métodos.....	55
4.2.1 Local de amostragem	55
4.2.2 Isolamento Seletivo para actinobactérias	58
4.2.3 Identificação molecular de actinobactérias.....	60
4.2.4 Extração dos metabólitos secundários	61
4.2.5 Atividade antifúngica dos extratos de actinobactérias.....	62
4.2.6 Perfil químico dos extratos brutos	62

4.3 Resultados e Discussão	63
4.3.1 Identificação da esponja marinha	63
4.3.2 Isolamento Seletivo	63
4.3.3 Identificação molecular de actinobactérias	64
4.3.4 Atividade antifúngica de extratos bruto de actinobactérias.....	70
4.3.5 Perfil químico dos extratos brutos.....	74
Referências.....	86
5 ATIVIDADE HERBICIDA DO COMPOSTO BUTENOLIDA PRODUZIDO PELO <i>STREPTOMYCES</i> SP. ASPSP 103	93
Resumo	93
Abstract	93
5.1 Introdução.....	94
5.2 Material e Métodos	95
5.2.1 Local de amostragem	95
5.2.2 Isolamento Seletivo	96
5.2.3 Identificação molecular	96
5.2.4 Obtenção dos metabólitos secundários.....	97
5.2.5 Bioensaio de fitotoxicidade com a alga <i>Selenastrum capricornutum</i>	97
5.2.6 Avaliação da atividade herbicida	98
5.2.7 Caracterização química dos compostos bioativos do extrato bruto de <i>Streptomyces</i> ASPSP 103.....	100
5.2.8 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica e preparativa e frações por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	101
5.2.9 Análise das amostras por espectrometria de massas (EM).....	101
5.2.10 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN).....	102
5.3 Resultados e Discussão	103
5.3.1 Identificação da esponja marinha	103
5.3.2 Isolamento Seletivo e Identificação molecular.....	103
5.3.3 Avaliação da atividade algicida em <i>Selenastrum capricornutum</i>	104
5.3.4 Bioensaio para avaliação da atividade herbicida dos extratos brutos.....	107
5.3.5 Análise por CLAE-UV analítico, CLAE-UV preparativo e CCDC	111
5.3.6 Análise por espectrometria de massas via ESI-EM, ESI-EM/EM e CLUE-EM	112

5.3.7 Análise da subfração Fr 17-20 por RMN de ¹ H, COSY, gHSQC e gHMBC ...	117
5.3.8 Atividade herbicida pré-emergência do composto butenolida	120
Referências	125
6 <i>STREPTOMYCES ATLANTICUS</i> SP. NOV, UM NOVO ACTINOMICETO ISOLADO DA ESPONJA <i>APLYSINA FULVA</i> , PRODUTOR DO COMPOSTO BUTENOLIDA	131
Resumo	131
Abstract	131
6.1 Introdução	132
6.2 Material e Métodos	133
6.2.1 Local de amostragem	133
6.2.2 Isolamento Seletivo	133
6.2.3 Identificação molecular e análises filogenética	134
6.2.4 Quimitaxonomia	135
6.2.5 Propriedades fenotípicas	135
6.2.6 Avaliação de bioatividade do extrato de ASPSP 103 ^T	136
6.3 Resultados e Discussão	136
6.3.1 Identificação taxonômica da esponja marinha	136
6.3.2 Identificação molecular e análise filogenética	137
6.3.3 Quimiotaxonomia	140
6.3.4 Propriedades fenotípicas	140
6.4 Descrição da espécie <i>Streptomyces atlanticus</i> sp. nov.	146
Referências	147
7 CONCLUSÕES FINAIS	153
ANEXOS	155

1	INTRODUÇÃO
1	1.1 Justificativa
1	1.2 Objetivos
1	1.3 Metodologia
1	1.4 Estrutura da tese
1	2 CONCLUSÕES FINAIS
1	3 ANEXOS
1	3.1
1	3.2
1	3.3
1	3.4
1	3.5
1	3.6
1	3.7
1	3.8
1	3.9
1	3.10
1	3.11
1	3.12
1	3.13
1	3.14
1	3.15
1	3.16
1	3.17
1	3.18
1	3.19
1	3.20
1	3.21
1	3.22
1	3.23
1	3.24
1	3.25
1	3.26
1	3.27
1	3.28
1	3.29
1	3.30
1	3.31
1	3.32
1	3.33
1	3.34
1	3.35
1	3.36
1	3.37
1	3.38
1	3.39
1	3.40
1	3.41
1	3.42
1	3.43
1	3.44
1	3.45
1	3.46
1	3.47
1	3.48
1	3.49
1	3.50
1	3.51
1	3.52
1	3.53
1	3.54
1	3.55
1	3.56
1	3.57
1	3.58
1	3.59
1	3.60
1	3.61
1	3.62
1	3.63
1	3.64
1	3.65
1	3.66
1	3.67
1	3.68
1	3.69
1	3.70
1	3.71
1	3.72
1	3.73
1	3.74
1	3.75
1	3.76
1	3.77
1	3.78
1	3.79
1	3.80
1	3.81
1	3.82
1	3.83
1	3.84
1	3.85
1	3.86
1	3.87
1	3.88
1	3.89
1	3.90
1	3.91
1	3.92
1	3.93
1	3.94
1	3.95
1	3.96
1	3.97
1	3.98
1	3.99
1	3.100
1	3.101
1	3.102
1	3.103
1	3.104
1	3.105
1	3.106
1	3.107
1	3.108
1	3.109
1	3.110
1	3.111
1	3.112
1	3.113
1	3.114
1	3.115
1	3.116
1	3.117
1	3.118
1	3.119
1	3.120
1	3.121
1	3.122
1	3.123
1	3.124
1	3.125
1	3.126
1	3.127
1	3.128
1	3.129
1	3.130
1	3.131
1	3.132
1	3.133
1	3.134
1	3.135
1	3.136
1	3.137
1	3.138
1	3.139
1	3.140
1	3.141
1	3.142
1	3.143
1	3.144
1	3.145
1	3.146
1	3.147
1	3.148
1	3.149
1	3.150
1	3.151
1	3.152
1	3.153
1	3.154
1	3.155
1	3.156
1	3.157
1	3.158
1	3.159
1	3.160
1	3.161
1	3.162
1	3.163
1	3.164
1	3.165
1	3.166
1	3.167
1	3.168
1	3.169
1	3.170
1	3.171
1	3.172
1	3.173
1	3.174
1	3.175
1	3.176
1	3.177
1	3.178
1	3.179
1	3.180
1	3.181
1	3.182
1	3.183
1	3.184
1	3.185
1	3.186
1	3.187
1	3.188
1	3.189
1	3.190
1	3.191
1	3.192
1	3.193
1	3.194
1	3.195
1	3.196
1	3.197
1	3.198
1	3.199
1	3.200

RESUMO

Bioprospecção de actinobactérias associadas à esponja marinha *Aplysina fulva*: isolamento, caracterização e produção de compostos bioativos

Este estudo descreve a diversidade de actinobactérias isoladas da esponja marinha *Aplysina fulva* e o potencial destes microorganismos como produtores de metabólitos bioativos com propriedades fungicidas e herbicidas. Actinobactérias são prolíficas produtoras de compostos farmacologicamente importantes, pois cerca de 70% dos antibióticos naturalmente derivados que estão atualmente em uso clínico são produzidos por estes microorganismos. Entretanto este valor é ainda inexpressivo na indústria agrícola. Agroquímicos sintéticos ainda são dominantes no mercado apesar de estarem menos efetivos contra plantas daninhas e patógenos cada vez mais resistentes. Neste trabalho, um total de 21 actinobactérias foram isoladas com a utilização de meios seletivos. Análises filogenéticas baseadas no sequenciamento parcial do gene que codifica para o rRNA 16S mostrou que estes microorganismos pertencem a oito gêneros do filo *Actinobacteria*: *Kocuria*; *Citricoccus*; *Terrabacter*; *Gordonia*; *Agrococcus*; *Tsukamurella*; *Brevibacterium* e *Streptomyces*. Os extratos de todos os isolados foram testados para verificar a produção de metabólitos secundários com propriedades fungicidas contra os fungos fitopagênicos de importância agrícola: *Pythium aphanidermatum*; *Phytophthora capsici* e *Magnaporthe grisea*. O extrato bruto de 43% dos isolados mostrou atividade fungicida para ao menos um dos patógenos. O perfil químico do extrato dos isolados com bioatividade positiva foram similares mesmo entre gêneros diferentes. Os metabólitos do *Streptomyces* ASPSP 103 foram mais eficientes devido à forte inibição contra todos os patógenos testados. Portanto este isolado foi selecionado e testado para atividade herbicida por meio de *screening* que teve início com testes de atividade algicida contra a microalga *Selenastrum capricornutum*. Acreditamos que actinobactérias associadas a esponjas marinhas desempenham um papel de defesa química contra microalgas que possam obstruir os porócitos asfixiando o animal, e que estes compostos algicidas possivelmente tenham ação herbicida. Foi verificada atividade do extrato bruto do *Streptomyces* ASPSP 103 contra *S. capricornutum*, e a atividade herbicida pré-emergência com um efeito fraco em *Lactuca sativa* (dicotiledônea) e uma forte inibição em *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea). A purificação do extrato bruto para isolamento do composto bioativo foi guiado por bioensaio contra *Pythium aphanidermatum*, um oomiceto de rápido crescimento e sensível aos metabólitos de ASPSP 103 previamente testados. Foi identificado o composto da classe butenolida com atividade herbicida pré-emergência contra *Agrostis stolonifera* (IC₅₀ 33.43 µg/mL). Este é o primeiro relato da atividade de butenolida para atividade herbicida. Estudos aprofundados em taxonomia mostraram que as características filogenéticas, morfológicas e químicas do isolado ASPSP 103 são consistentes com o gênero *Streptomyces*. Portanto devido algumas diferenças em parâmetros taxonômicos, ASPSP 103^T foi proposto como linhagem tipo para uma nova espécie de *Streptomyces*, para qual o nome *Streptomyces atlanticus* sp. nov. foi sugerido. Estes resultados enfatizam o potencial de *Streptomyces* marinhos para produzir compostos bioativos com potencial de aplicação em agrobiotecnologia.

Palavras-chave: Metabólitos secundários; Fungicidas; *Pythium aphanidermatum*; *Phytophthora capsici*; *Magnaporthe grisea*; Algicida; *Selenastrum capricornutum*; Herbicida; Pré-emergência; *Agrostis stolonifera*; Taxonomia polifásica; Bioprospecção

ABSTRACT

Bioprospecting of actinobacteria associated with marine sponge *Aplysina fulva*: isolation, characterization and production of bioactive compounds

Actinobacteria are producers of important pharmacological compounds. About 70% of natural antibiotics are derived from these microorganisms. However, the use of natural compounds are still limited in the agricultural industry, even considering that synthetic pesticides are less effective against pathogens and weed plants. This study describes the diversity of actinobacteria associated with the marine sponge *Aplysina fulva* and their potential as producers of bioactive compounds with fungicidal and herbicidal properties. In this study, a total of 21 actinomycetes were isolated with the use of selective media. Phylogenetic analyzes based on partial sequencing of the gene encoding for 16S rRNA showed that these microorganisms belong to eight Actinobacteria genera, including *Kocuria*, *Citricoccus*, *Terrabacter*, *Gordonia*, *Agrococcus*, *Tsukamurella*, *Brevibacterium* and *Streptomyces*. The extracts of all isolates were tested for the production of secondary metabolites with fungicidal properties against the following phytopathogenic fungi: of *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* and *Magnaporthe grisea*. The crude extract of 43% of the isolates showed fungicidal activity for at least one of the pathogens. The chemical profiles of the actinobacteria extracts with positive bioactivity were similar even among different genus. The metabolites of *Streptomyces* ASPSP 103 were more efficient because of the strong inhibition against all tested pathogens. So, the isolate ASPSP 103 was selected and tested for herbicide activity through screening for algaecide activity towards microalgae *Selenastrum capricornutum*. We believe that actinobacteria associated with marine sponges play a role in chemical defense against algae that can obstruct the pores, choking the animal. These algaecides compounds possibly have herbicide action. Activity of the *Streptomyces* ASPSP 103 crude extract against *S. capricornutum* was observed. In addition, it was observed a weak pre-emergence herbicide activity on *Lactuca sativa* (dicot) and a strong inhibition in *Agrostis stolonifera* (monocot). The purification of the crude extract to isolate the bioactive compound was guided by bioassay against *Pythium aphanidermatum*, a fast growing oomycete and sensitive to metabolites from ASPSP 103 previously tested. The butenolide compound was identified with pre-emergence herbicidal activity against *Agrostis stolonifera* (IC₅₀ 33.43 µg/mL). This is the first report of butenolide activity with herbicide activity. Taxonomy studies showed that the phylogenetic, morphological and chemical characteristics of the isolated ASPSP 103 are consistent with the *Streptomyces* genus. Then, considering some differences in taxonomic parameters, ASPSP 103^T was proposed as line type for a new species of *Streptomyces*, for which the name *Streptomyces atlanticus* sp. nov. was suggested. These results emphasize the potential of marine *Streptomyces* to produce bioactive compounds with potential biotechnological application in agricultural industry.

Keywords: Secondary metabolites; Fungicides; *Pythium aphanidermatum*; *Phytophthora capsici*; *Magnaporthe grisea*; algaecide; *Selenastrum capricornutum*; Herbicide; Pre-emergence; *Agrostis stolonifera*; Polyphasic taxonomy; Bioprospecting

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

...the ... of ... and ...

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema básico da estrutura corporal de Porífera (CERÁVOLO, 2011) ..	39
Figura 2 - Esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> . (Fotografada por G. Muricy)	44
Figura 3 - Localização do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, situado no Oceano Atlântico Equatorial (0°54'57"N; 29°20'41"W) inserido na Zona de Fratura de São Paulo. Ponto e flexa em vermelho indicam a localização (fonte: Google Earth)	53
Figura 4 - Localização do ponto de coleta da esponja marinha (círculo vermelho) situado na face leste do Arquipélago de São Pedro e São Paulo	57
Figura 5 - Esquema de coleta de esponja marinha na face leste do Arquipélago de São Pedro e São Paulo.....	58
Figura 6 - Relações filogenéticas (400pb) do gene 16S rRNA entre as linhagens de actinobactérias isoladas da esponja marinha <i>Aplysina fulva</i>	65
Figura 7 - Gráfico do número de gêneros de actinobactérias isoladas nos diferentes meios de cultivo	69
Figura 8 - Espectros de massas (ESI-MS) dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE.....	74
Figura 9 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 55 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE	75
Figura 10 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 57 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE.....	77
Figura 11 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 59 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE	78
Figura 12 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 67 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE	79
Figura 13 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 103 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE	81
Figura 14 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 107 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE	82
Figura 15 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 153 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE.....	84
Figura 16 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 313 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE	85

- Figura 17 - Esquema representativo do bioensaio para atividade herbicida do extrato bruto do isolado ASPSP 103..... 100
- Figura 18 - Curvas de crescimento da microalga *S. capricornutum* exposta ao solvente DMSO 1% v/v, herbicida atrasina e ao extrato do *Streptomyces* ASPSP 103 em concentrações variadas..... 106
- Figura 19 - Atividade algicida do extrato de *Streptomyces* ASPSP 103 contra a microalga *S. capricornutum*..... 109
- Figura 20 - Efeito da atividade herbicida pré-hermergente de extratos brutos do *Streptomyces* marinho ASPSP 103 cultivado em diferentes meios de cultivo. (A) Sementes de *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea). (B) sementes de *Lactuca sativa* (dicotiledônea) 110
- Figura 21 - Espectros de massas *Full-Scan* em modo positivo de análise: A) Extrato Bruto 103; B) Fração ativa G1; C) Subfração ativa Fr 17-20 112
- Figura 22 - Espectros de massas tandem (ESI-EM/EM) dos íons precursores protonados: A) Íon precursor de m/z 912; B) Íon precursor de m/z 898. 113
- Figura 23 - Sequência de fragmentação dos resíduos peptidólicos da surugamida A (1). 114
- Figura 24 - Cromatogramas de íons extraídos (EIC) de A) m/z 225, B) m/z 898 e C) m/z 912, presentes no extrato bruto 103 e seus respectivos espectros de massas. 115
- Figura 25 - Cromatograma de corrente iônica total (TIC) da subfração ativa Fr 17-20. 116
- Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H da subfração Fr 17-20 (500 MHz, CDCl_3) δ 1,09 (d, $J=7,01$ Hz, 3 H), 1,23-1,30 (m, 2 H), 1,31-1,39 (m, 4 H), 1,43-1,50 (m, 2 H), 1,62-1,70 (m, 4 H), 1,73-1,82 (m, 2 H), 2,14 (s, 3 H), 2,50 (sxt, $J=6.70$ Hz, 1 H), 5.02 - 5.06 (m, 1 H), 6.12 (dd, $J=5.84, 1.95$ Hz, 1 H), 7.45 (dd, $J=5.71, 1.56$ Hz, 1 H)..... 117
- Figura 27 - Estrutura química da butenolida..... 118
- Figura 28 - Correlações mais significantes observadas nos espectros bidimensionais da butenolida..... 119
- Figura 29 - Efeito da atividade herbicida pré-hermergente do extrato de ASPSP 103 obtido do meio de cultivo GYE + peptona; extrato GYE + peptona

purificado e da molécula pura (butenolida) isolada do meio GYE + peptona em sementes de *Agrostis stolonifera*124

- Figura 30 - Relações filogenéticas do gene que codifica para o rRNA 16S entre a linhagem ASPSP 103^T (1466 pb) e as linhagens tipo do gênero *Streptomyces* mais próximos baseadas no método evolutivo de *Neighbour-Joining* com utilização do programa computacional Mega 5.2. Losangos pretos indicam ramos da árvore recuperados no algoritmo evolutivo *Maximum Likelihood*, e losangos brancos indicam ramos da árvore recuperados nos algoritmos evolutivos de *Maximum Likelihood* e *Maximum Parsimony*. Números nos nós representam as porcentagens de suporte (*bootstrap*) baseados nas análises de *Neighbour-Joinng/Maximum Likelihood* ou *Neighbour-Joinng/Maximum Likelihood/Maximum Parsimony* usando 1000 pseudorepetições (apenas valores de 50 % são representados). Código de acesso das sequências no *GenBank* esta representado entre parênteses. Barra de 0.005 substituições por posição nucleotídica 139
- Figura 31 - Variações morfológicas da linhagem ASPSP 103^T crescidas em meio *Internacional Streptomyces Project (ISP 1- 7)*, TSBA, CZAPEK e Ágar Nutriente..... 141
- Figura 32 - Eletromicrografia de varredura da linhagem ASPSP 103^T, crescida em meio *Internacional Streptomyces Project - ISP 3*, durante 21 dias, 28 °C. A – Característica da colônia com estruturas morfológicas visíveis: Δ esporângeo, ▲ hifas aéreas, ◇ esporos. B – Cadeia de esporos e hifas aéreas.....143

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos diferentes meios de cultivo utilizados para o isolamento de gêneros específicos de actinobactérias da esponja marinha <i>Aplysina fulva</i>	60
Tabela 2 - Composição dos diferentes meios de cultivo utilizados para a fermentação das actinobactérias isoladas da esponja marinha <i>Aplysina fulva</i>	61
Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos da água no sítio de coleta situado na Face Leste do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (0°54'57,86"N; 29°20'41,34"O).....	64
Tabela 4 - Afiliação taxonômica das actinobactérias isoladas da esponja marinha <i>Aplysina fulva</i>	68
Tabela 5 - Atividade antifúngica dos extratos bruto das actinobactérias isoladas da esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> . Os isolados foram fermentados em diferentes meios de cultivo. A extração foi realizada com diclorometano em diferentes faixas de pH.....	71
Tabela 6 - Procedimento OECD (<i>Guidelines for Testing Chemicals</i>) para preparo da solução-estoque do meio de cultivo de microalgas.....	99
Tabela 7 - Valores de absorvância indicando a taxa de crescimento da microalga <i>S. capricornutum</i> para cada período de exposição aos tratamentos	105
Tabela 8 - Avaliação da atividade herbicida pré-emergência em sementes de <i>Agrostis stolonifera</i> e <i>Lactuca sativa</i> . Cada tratamento foi conduzido em quadruplicata. Os valores representam a média da porcentagem de sementes germinas \pm o desvio padrão. O experimento foi avaliado 10 dias após serem aplicadas diferentes concentrações do extrato bruto do <i>Streptomyces</i> ASPSP 103 extraído de diferentes meios de cultivo	108
Tabela 9 - Equação da reta usada para calcular o IC ₅₀ (metade da concentração máxima inibitória) da atividade herbicida pré-emergente dos extratos brutos do <i>Streptomyces</i> marinho ASPSP 103 cultivado em diferentes meios de cultivo.....	109
Tabela 10 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H, RMN de ¹³ C e as correlações bidimensionais observadas para a butenolida	120

- Tabela 11 - Avaliação da atividade herbicida pré-emergência da molécula butenolida em sementes de *Agrostis stolonifera* e *Lactuca sativa*. Cada tratamento foi conduzido em quadruplicata. Os valores representam a média da porcentagem de sementes germinas \pm o desvio padrão. O experimento foi avaliado 10 dias após serem aplicadas diferentes concentrações do composto butenolida + DMSO 1 % v/v 122
- Tabela 12 - Equação da reta usada para calcular o IC₅₀ (metade da concentração máxima inibitória) da atividade herbicida pré-hermergente do extrato de ASPSP 103 obtido do meio de cultivo GYE + peptona; extrato GYE + peptona purificado e da molécula pura (butenolida) isolada do meio GYE + peptona em sementes de *Agrostis stolonifera*..... 123
- Tabela 13 - Crescimento e características de cultivo do isolado ASPSP 103^T em diferentes meios de cultivo após a incubação de 21 dias a 28 °C..... 142
- Tabela 14 - Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas do isolado ASPSP 103^T e espécies de *Streptomyces* filogeneticamente relacionados. Linhagem/espécime: 1 - *S. atlanticus*; 2 - *S. violascens*; 3 - *S. hydrogenans*; 4 - *S. somaliensis*; 5 - *S. albidoflavus*; 6 - *S. daghestanicus*; 7 - *S. koyangensis*. Dados para referencia dos espécimes foram conferidos no trabalho de Shirling e Gottlieb (1969) e Lee et al. (2005). +, positivo; -, negativo; ND, não determinado 145

1 INTRODUÇÃO

As descobertas de produtos naturais de origem marinha com potencial terapêutico despertaram o interesse da comunidade científica e de indústrias farmacêuticas internacionais há mais de meio século, principalmente devido à detecção de atividade antitumoral, anti-HIV, anti-parasítica, antibiótica e antioxidante de alguns dos compostos extraídos desses habitats.

O Brasil conta, atualmente, com poucos grupos de pesquisas voltados para exploração da incalculável biodiversidade existente nos diversos ecossistemas marinhos. Apesar do grande potencial de emprego desses compostos na agricultura, e do Brasil ser um dos maiores consumidores de agroquímicos do mundo, as pesquisas de aplicação ainda são incipientes, pois moléculas bioativas de origem natural têm sido pouco exploradas na indústria de pesticidas. Dessa forma, pesquisas visando à descoberta de novas substâncias com propriedades agroquímicas menos tóxicas e mais seletivas necessitam ser incentivadas, com o objetivo de tornar o país menos dependente destes insumos.

Algumas atividades agrícolas estão começando a empregar compostos naturais, com funções de pesticidas (herbicidas, inseticidas, nematicidas, larvicidas, repelentes, antiparasíticos, acaricidas e algicidas). Porém, neste setor, ainda é crescente a necessidade de novos fungicidas mais eficientes e seletivos para determinados patógenos; e principalmente de novos herbicidas com perfil de baixa toxicidade ambiental e novos mecanismos de ação, para a substituição de produtos que são utilizados extensivamente há anos, por questões de segurança, devido ao rápido estabelecimento de plantas daninhas resistentes. Estrategicamente, o desenvolvimento de agroquímicos a partir de produtos naturais marinhos representa uma inovação tecnológica num campo em que o país sempre dependeu de tecnologia estrangeira.

Nesse sentido, uma fonte extremamente importante de compostos bioativos são as bactérias do filo *Actinobacteria*. Cerca de dois-terços de todos os compostos naturais atualmente utilizados pela indústria são produzidos por esse grupo de microorganismos, que são largamente distribuídos em habitats terrestres e marinhos.

Actinobactérias de ambientes marinhos podem ser valiosas fontes de moléculas bioativas com potencial aplicação na indústria agroquímica. Neste

ambiente alguns habitats favorecem a prospecção de actinobactérias como, por exemplo, o interior do corpo de esponjas marinhas. Vários estudos mostram que actinobactérias associadas a poríferas produzem grande diversidade de novos compostos químicos como policetídeos, isoprenóides, fenazinas, peptídeos, indolocarbazoles e esteróis. Esses compostos têm mostrado atividade antifúngica, antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante e antitumoral, entre outras, o que tornam as actinobactérias associadas às esponjas marinhas um importante recurso biotecnológico.

As esponjas marinhas são animais primitivos que utilizam a filtração da água periférica para efetuarem trocas gasosas e se alimentarem de microrganismos e pequenas partículas orgânicas captadas. Talvez por este motivo estes animais alberguem grande diversidade de micro-organismos no interior de seu corpo. Também, é discutido no meio científico que a alta biomassa de microrganismos associados às esponjas marinhas desempenha um papel de defesa química por meio da produção de metabólitos secundários, que protegem a esponja contra patógenos, herbivoria ou predação.

Neste estudo é defendida a hipótese de que actinobactérias associadas às esponjas marinhas desempenhem um papel de defesa química contra a proliferação de microalgas ou outros microrganismos, que poderiam promover a formação de biofilme, obstruindo os porócitos e asfixiando o animal. Estes possíveis metabólitos bioativos podem ter ação fungicida, algicida e também atuar como herbicidas seletivos.

Para tal propósito, foram coletadas amostras da esponja marinha *Aplysina fulva*, uma das espécies mais prevalentes no remoto Arquipélago de São Pedro e São Paulo no Oceano Atlântico Equatorial, visando prospecção de novos agroquímicos produzidos por actinobactérias associadas a essa esponja.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

O objetivo principal desse estudo foi proceder à bioprospecção de actinobactérias associadas à esponja marinha *Aplysina fulva*, envolvidas na produção de compostos bioativos com propriedades fungicidas, algicidas ou herbicidas.

2.2 Objetivos específicos

-Isolar actinobactérias de *Aplysina fulva* empregando meios seletivos específicos;

-Avaliar a diversidade biológica e química de actinobactérias cultiváveis;

-Avaliar a atividade fungicida, algicida e herbicida dos metabólitos produzidos por actinobactérias;

-Isolar, purificar e elucidar a estrutura química dos compostos com atividade herbicida;

-Identificar taxonomicamente possíveis espécies novas de actinobactérias.

2.1. Descrição do método

Este método consiste em aplicar a técnica de análise de componentes principais (PCA) sobre as variáveis de interesse, com o objetivo de reduzir a dimensionalidade dos dados e identificar os principais fatores que influenciam a resposta. Para isso, foram calculados os valores próprios e os respectivos vetores próprios para a matriz de covariância das variáveis. Os dados foram padronizados previamente.

2.2. Resultados

Foram analisados os dados coletados durante o experimento. Os resultados mostram que as primeiras três componentes principais explicam aproximadamente 85% da variância total dos dados. A primeira componente principal está fortemente relacionada com a temperatura ambiente, a segunda com a umidade relativa do ar e a terceira com a velocidade do vento. A análise de variância (ANOVA) revelou que existem diferenças significativas entre os tratamentos para as variáveis de interesse. Além disso, foram observadas correlações fortes entre algumas das variáveis analisadas, o que pode indicar interações entre elas. Os resultados obtidos serão discutidos em detalhes na seção de discussão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A demanda por novos agroquímicos e a importância das Actinobactérias para a agrobiotecnologia

No setor de agroquímicos, o mercado de herbicidas, pesticidas e fungicidas ambientalmente aceitos movimentam em torno de 50 bilhões de dólares por ano, sendo maior até que o mercado médico/farmacêutico (BÉRDY, 2005). Este amplo mercado teve início no Brasil a partir de meados do século passado, quando a indústria agroquímica começou a introduzir um arsenal crescente de pesticidas sintéticos, tais como o DDT e 2,4-D (COPPING; DUKE, 2007). Entretanto, no que se diz respeito à proteção do meio ambiente, pesticidas sintéticos freqüentemente têm baixa especificidade e são pouco biodegradáveis, acumulando-se em águas, solos e em outras culturas não desejadas; causando poluição ambiental e criando problemas para a saúde humana e animal (RIMANDO; DUKE, 2006). Neste contexto, há uma grande necessidade de obtenção de pesticidas menos tóxicos e ambientalmente seguros (COPPING; DUKE, 2007).

Alguns estudos têm mostrado que moléculas bioativas produzidas por actinobactérias podem atuar como pesticidas (inseticidas, nematicidas, larvicidas, repelentes, antiparasíticos, acaricidas, algicidas), e herbicidas com agentes fitoativos (fitotoxina, reguladores de crescimento, aleloquímicos). Estes compostos muitas vezes são menos tóxicos ou pelo menos mais biodegradáveis do que os herbicidas sintéticos (RIMANDO; DUKE, 2006; COPPING; DUKE, 2007; DHANASEKARAN et al., 2010).

Atualmente, o controle químico convencional contra alguns fungos não tem sido efetivo, o que tem causado grandes perdas em culturas devido à resistência de fitopatógenos como *Pythium aphanidermatum*; *Phytophthora capsici* e *Magnaporthe grisea*. O patógeno *P. aphanidermatum* pertence ao grupo dos oomicetos, que diferem dos fungos verdadeiros por possuir a parede celular construída de celulose, ao invés de quitina. É um patógeno de solo de grande importância agrícola, uma vez que causa tombamento em plântulas de milho, algodão, cereais e hortaliças (RACHNIYOM; JAENAKSORN, 2008). Assim com *Pythium aphanidermatum*, o patógeno *Phytophthora capsici* é um oomiceto de grande importância por ser o agente causal da podridão em pimentas e danos em outras culturas como feijão,

berinjela, tomate, abóbora, melão e pepino (HAUSBECK; LAMOUR, 2004). Já *Magnaporthe grisea* é um fungo ascomiceto, e um patógeno vegetal extremamente eficaz, com reprodução sexuada e assexuada. *M. grisea* produz estruturas infecciosas conhecidas como apressórios, que infectam tecidos aéreos, e hifas, que podem infectar os tecidos da raiz. *M. grisea* é o agente causal da brusone do arroz, trigo, centeio, cevada e moxoeira (LI et al., 2015).

Com relação aos herbicidas sintéticos, esses são empregados no controle de várias espécies de plantas daninhas causadoras de perdas econômicas por competirem com a cultura principal por água, luz e nutrientes. Estima-se que 8 a 15% das culturas são perdidas anualmente apesar da aplicação contínua de herbicidas sintéticos (DAYAN; DUKE, 2014). Nesse setor, não houve lançamentos de herbicidas com novos mecanismos de ação nos últimos 20 anos. Tal fato, associado à rápida evolução da resistência de ervas daninhas aos herbicidas comerciais atuais, tornam urgente a necessidade de novas classes de herbicidas (DAYAN; DUKE, 2014).

Nesse sentido, os metabólitos secundários microbianos conhecidos como fitotoxinas (LI et al., 2003) são uma viável alternativa no controle de plantas daninhas, pois possuem estruturas químicas com mecanismos de ação específicos, podendo ser explorados como herbicidas comerciais (SANODIYA et al., 2010). Essa atividade herbicida dos metabólitos secundários, produzidos principalmente por espécies de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, tem sido estudada em pesquisas agroquímicas, em especial após a descoberta do tripeptídeo denominado bialafos, isolado de *S. hygroscopicus* e *S. viridochromogenes*. O bialafos (ASHFORTH et al., 2010) é um herbicida pós-emergente que é degradado em fosfinitricina pelas plantas daninhas alvo (DUKE et al., 2000). Plantas daninhas expostas ao bialafos inibem a enzima glutamina sintetase, aumentando os níveis de amônia nos tecidos e causando intoxicação da célula, e consequente morte da planta (DUKE, 2005).

Um grande gargalo para a pesquisa e desenvolvimento de novos agroquímicos é o alto custo associado à criação de um novo produto. Algumas estratégias de *screening* de compostos bioativos aliadas a técnicas espectrométricas podem ser empregadas para direcionar a seleção de compostos bioativos de forma menos onerosa.

Uma metodologia eficiente para o *screening* de compostos com atividade herbicidas é o emprego de microalgas. Esses organismos possuem um papel significativo como produtores primários nos ecossistemas aquáticos, e por esta razão são usadas em estudos ambientais para avaliar a toxicidade de produtos químicos ou descargas de resíduos (KOVACEVIC et al., 2008; FORTÚN; MARVÁ; D'ORS, 2008). Devido a sua simplicidade estrutural, abundância na natureza e alta sensibilidade a pequenas quantidades de amostra, suspensões de células de microalgas são usadas cada vez mais na pesquisa agroquímica para triagem de herbicidas. Comparados com outros organismos, os bioensaios com microalgas são mais simples, rápidos, sensíveis e de baixo custo (NICOLAS; HIROYUKI, 2002; MA et al., 2002; PRADO, et al., 2009).

A aplicação de técnicas de espectrometria de massas (MS) pode ser utilizada para a identificação e desreplicação de compostos selecionados. Porém, dada a complexidade dos metabólitos microbianos, em algumas situações há necessidade de uma separação cromatográfica para se reduzir os interferentes que causam a supressão de íons (espécies mais facilmente ionizáveis mascarando a presença de espécies menos ionizáveis) (GARCIA et al., 2008). Neste contexto, o acoplamento da de técnicas de MS com técnicas cromatográficas, em especial a cromatografia líquida (HPLC-MS e HPLC-MS/MS), permite a identificação e a quantificação de metabólitos secundários polares, mediantemente polares e neutros, principalmente por causa de sua compatibilidade com fontes de ionização brandas, tais como a espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS), espectrometria de massas com ionização sobre pressão atmosférica (API-MS) e espectrometria de massas com ionização química sobre pressão atmosférica (APCI-MS); entre outras. Estas técnicas são eficientes até mesmo quando os compostos estão presentes em concentrações relativamente baixas em uma amostra (VILLAS-BÔAS et al., 2004). Alguns métodos podem ser utilizados para a identificação de metabólitos em extratos brutos de microrganismos, tais como cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) para compostos voláteis e termicamente estáveis, e cromatografia líquida de alta precisão com detector *Diode-Array* (HPLC-DAD). Para compostos que não são voláteis e termicamente estáveis pode ser utilizada a cromatografia líquida de alta precisão-ressonância magnética nuclear (HPLC-NMR) ou HPLC-MS (WOLF; SIEMS, 2008). O HPLC-MS e particularmente HPLC-MS/MS, são ferramentas analíticas bastante utilizadas para esta finalidade.

Com analisadores de alta resolução como o espectrômetro de massas *Quadrupole Time of Flight* (QTOF), *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* (FT-ICR) ou técnicas não dependentes de separação cromatográfica como MS/MS e espectrometria de massas com *Íon Trap* (MSⁿ), é possível se obter informações a respeito das massas moleculares exatas dos metabólitos presentes no extrato bruto, bem como informações estruturais que são deduzidas a partir dos padrões de fragmentação dos compostos. Desta forma o conjunto de dados gerados por estas técnicas são compilados e interpretados nos processos de desreplicação de produtos naturais (MCDONALD et al., 2003; KONISHI et al., 2007).

Embora a aplicação de produtos naturais como agroquímicos constitua um grande desafio para a agricultura tradicional e orgânica, esta nova perspectiva tecnológica pode ser alcançada com a busca de moléculas bioativas produzidos por microrganismos, em especial por actinobactérias. Devido à diversidade estrutural, metabólitos bioativos produzidos por actinobactérias oferecem uma gama de possibilidades que podem ser utilizados como modelo para o desenvolvimento de compostos com novos mecanismos de ação, não somente como herbicidas, mas também como fungicida ou outros pesticidas. Considerando-se que o Brasil é o maior consumidor de agroquímicos do mundo, moléculas naturais menos tóxicas oferecem uma grande oportunidade de colocar o país na vanguarda de uma agricultura mais sustentável (BÉRDY, 2005).

3.2 Actinobacterias em ambientes marinhos

Actinobacteria é um distinto filo do domínio Bacteria. Este grupo é atualmente composto por 48 gêneros, e amplamente distribuído na natureza (ZUCCHI et al., 2012). São atribuídos a ele importantes papéis no ambiente, como ciclagem de compostos orgânicos; produção de matéria orgânica no solo, incluindo produção de pigmentos relacionados ao ácido húmico; produção de enzimas e metabólitos secundários que desempenham fatores de sinalização e homeostase da comunidade microbiana (GOODFELLOW, 2010). São basicamente caracterizadas por serem bactérias gram-positivas e por conter alto conteúdo G+C (> 50%) em seu genoma. Alguns gêneros cultiváveis são de grande importância médica e biotecnológica, como *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* (GOODFELLOW, 2012).

As moléculas bioativas produzidas por estes microrganismos vêm sendo amplamente aplicadas na indústria farmacêutica, principalmente com o desenvolvimento de novos antibióticos; e também na indústria agrícola, onde já se utilizam alguns compostos com funções de pesticidas. Devido à vasta produção de substâncias bioativas, actinobactérias são amplamente estudadas em ambientes terrestres, onde a competição entre a microbiota residente seleciona as células com melhores aparatos químicos para sobrevivência. Acredita-se que neste ambiente as moléculas bioativas produzidas por actinobactérias e outros microrganismos venham evoluindo desde os primórdios da vida na Terra e, portanto, este fato explicaria a enorme diversidade de metabólitos microbianos de grande valor biotecnológico (BALTZ, 2006a). Entretanto, na última década houve uma forte redução de descobertas relativas a novas biomoléculas produzidas por actinobactérias tornando-se necessária a procura por novas espécies em nichos até então inexplorados. Nesse contexto, o ambiente marinho destaca-se como um grande reservatório microbiano ainda pouco explorado quanto à prospecção dessas moléculas (KOCABAS, 2012).

Aproximadamente 95 % da biosfera do planeta é representada pelos oceanos (BERNAN et al., 1997). Neste ambiente, actinobactérias tiveram ao longo de sua história evolutiva uma série de modificações metabólicas adaptativas, o que resultou em uma seleção de vias biossintéticas únicas quando comparadas com as linhagens de ambientes terrestres (JENSEN et al., 2005).

A presença de actinobactérias em ambientes marinhos foi primeiramente demonstrada por Weyland (1969); porém, acreditava-se que estes organismos tinham procedência terrestre, sendo levados ao mar por escoamento ou por dispersão por circulação de ventos. Entretanto, estudos recentes demonstram que algumas espécies deste grupo são encontradas exclusivamente em habitats marinhos como sedimentos, ou associadas principalmente a invertebrados, como ascídias e esponjas marinhas (SUN et al., 2010; DUPONT et al., 2014).

3.3 Estratégias de isolamento de actinobactérias marinhas

As técnicas moleculares atuais permitem estimar que apenas 1% das bactérias existentes são cultiváveis (KELLER; ZENGLER, 2004). Essas técnicas também revelam a existência de pelo menos 61 filos distintos de bactérias, dos

quais 31 ainda não foram cultivados. Apesar de novas ferramentas moleculares serem amplamente utilizadas para inferência da diversidade microbiana, a ampla diversidade metabólica de actinobactérias em ambientes marinhos é praticamente inexplorada, pois depende essencialmente do cultivo em laboratório (PATHOMAREE et al., 2006).

Atualmente, as metodologias de cultivo existentes ainda não conseguiram recriar de forma satisfatória as condições naturais para todos os microrganismos (ALAIN; QUERELLOU, 2009), pois meios artificiais são incapazes de mimetizar condições bióticas e abióticas requeridas para o crescimento de um determinado microrganismo, que acaba não se adaptando a estas condições alteradas. Estas dificuldades têm acarretado muitos erros nas condições de cultivos, principalmente no que diz respeito ao isolamento de microrganismos do tipo estrategistas K, que requerem baixa concentração de nutrientes para crescimento (VARTOUKIA; WADE, 2010). Alguns parâmetros de grande importância que afetam diretamente as interações e metabolismo são: pH, temperatura, pressão, potencial redox, concentração de oxigênio, salinidade e tempo de crescimento. Estas condições podem ditar as características e taxas de crescimento de cada espécie, por esta razão novas técnicas de cultivo devem considerar estes parâmetros (DURBIN, 1961).

Desta forma, o desenvolvimento de novas técnicas de cultura e meios de cultivo pode auxiliar no processo de identificação de novas espécies marinhas, pois as metodologias atualmente utilizadas são, frequentemente, adaptações de metodologias obtidas para ambientes terrestres (FENICAL; JANSEN, 2006). Além disso, estudos têm mostrado que a baixa diversidade de espécies de isolados de ecossistemas marinhos seja um reflexo da utilização de condições metodológicas inapropriadas para bioprospecção de membros de novos táxons, uma vez que a maioria dos meios de cultura são adaptados para solos (meios ricos e seletivos para microrganismos de crescimento rápido) (MALDONADO et al., 2005).

Consequentemente, o uso de meio de cultura com nutrientes diluídos tem obtido sucesso no cultivo de bactérias até então não cultivadas, oriundas de diversos ambientes (CONNON; GIOVANNONI, 2002). Bactérias em ambientes oligotróficos apresentam crescimento muito lento, cujo período de incubação é um pré-requisito para o cultivo (VARTOUKIAN et al., 2010). Em ambientes ricos em nutrientes e também em ambientes oligotróficos, espécies de *Streptomyces* são as

actinobactérias mais comumente isoladas e cultivadas, sendo, portanto, o gênero mais encontrado em coleções de cultura.

Gêneros raros de actinobactérias normalmente compreendem organismos fastidiosos, isolados com frequência muito menor que estreptomicetos quando aplicados os métodos convencionais de cultivo (TIWARI et al., 2012). Devido à dificuldade de isolamento, tais gêneros raros são possivelmente fontes ainda não exploradas de novas moléculas bioativas (BALTZ, 2006b). Métodos para isolar estes micro-organismos não são dependentes de uma única técnica, mas de desenhos efetivos de metodologias usando informações geradas por meio de estudos taxonômicos (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010). A prospecção de novas espécies ou gêneros raros através de combinações de métodos de pré-tratamentos das amostras tem sido efetiva. Vários procedimentos e meios de cultura seletivos têm sido usados para aumentar o acesso à diversidade microbiana, com a finalidade de mimetizar ao máximo o ambiente em que se encontram estes microrganismos (TIWARI; GUPTA, 2012). Principalmente os procedimentos de pré-tratamento têm aumentado o número de isolados pertencentes a gêneros raros (TIWAR; GUPTA, 2012), sendo utilizado com frequência o aquecimento da amostra, a adição de fenol, ou a combinação de ambos (KIM et al., 1995; HAYAKAWA et al., 1997). Métodos físicos utilizando ultrassom (JIANG et al., 2010) ou químicos, com o uso de agentes tóxicos ou antibióticos (BULINA et al., 1997), também têm se mostrado efetivos no isolamento de actinobactérias raras.

É importante frisar que sendo o ambiente marinho oligotrófico, alguns locais são considerados *hotspots* em biodiversidade, devido à alta disponibilidade e ciclagem de nutrientes. Recifes de corais e fumarolas oceânicas são bons exemplos, porém tratando-se do isolamento de gêneros raros de actinobactérias, esponjas e sedimentos têm sido os nichos mais explorados (KOBACAS, 2012).

As pesquisas em ambientes marinhos para bioprospecção de actinobactérias nesses "*hotspots*" devem, sobretudo, obedecer a um detalhe crucial nas coletas: a distância da costa. Isto se deve ao fato de que, quanto mais afastado estiver o ponto de coleta, menores as chances dos isolados serem de proveniência terrestre (KOCABAS, 2012). Além disso, o conhecimento da logística do sítio de amostragem é extremamente importante para a bioprospecção focada em espécies raras com potencial biotecnológico (BREDHOLDT et al., 2007).

3.4 Taxonomia de microorganismos

O conceito de espécie é a categoria fundamental utilizada em todas as classificações biológicas (VAN REGENMORTEL, 1992) e a sua definição e aplicação é sempre uma tarefa difícil (VALENTE et al., 1999). De um aspecto filosófico, a questão concentra-se na definição e delimitação do que é uma espécie em microbiologia, enquanto na perspectiva prática o problema está centrado no reconhecimento das espécies através das características morfológicas, fisiológicas e moleculares apresentadas. A definição de espécie, seja para plantas superiores, animais ou microrganismos tem sua base no princípio do isolamento genético. De acordo com Mayr (1970), espécies são grupos de populações naturais intercruzantes, os quais são isolados reprodutivamente de outros grupos.

A sistemática é o estudo da diversidade biológica, e, mais especificamente, é a ciência que descreve e classifica todos os organismos. A taxonomia, a nomenclatura e a filogenia são ramos da sistemática. Enquanto a nomenclatura designa o nome do organismo, os estudos filogenéticos contribuem para a classificação dos táxons em grupos geneticamente relacionados (ROSSMAN; PALM-HERNÁNDEZ, 2008). A taxonomia é uma ciência dinâmica que está associada com a síntese dos dados obtidos da bioquímica, biologia celular, genética, morfologia e fisiologia em um sistema de classificação útil e prático (MCGINNIS, 1980; GUARRO et al., 1999).

Já foi demonstrado que mutações pontuais ocorrem em microrganismos armazenados por longos períodos em coleções de culturas e que podem resultar em respostas significativamente modificadas em testes fisiológicos. Sabe-se também que mesmo quando métodos idênticos são empregados, os resultados podem variar de laboratório para laboratório (GUARRO et al., 1999). Para superar essas discrepâncias, uma abordagem polifásica foi proposta há quatro décadas, visando à integração dos diferentes dados e informações sobre os microrganismos. O termo "taxonomia polifásica" possivelmente foi introduzido por Colwell em 1970 para se referir a uma taxonomia que engloba diversos níveis de informações, levando em consideração características moleculares a ecológicas, incorporando porções de informações extraídas de um sistema não homogêneo com o intuito de gerar sistema taxonômico multidimensional.

A taxonomia de actinobactérias é extremamente complexa, e a classificação destes microrganismos unicamente com a utilização de métodos tradicionais, baseados em características morfológicas e fisiológicas, tem deixado várias lacunas e levado ao surgimento de grupos heterogêneos supragenéricos. Dessa forma, a abordagem polifásica da taxonomia surge como alternativa mais robusta para a classificação, pois reúne informações de diferentes campos: quimiotaxonomia, que diferencia espécies de acordo com a composição química da célula; taxonomia numérica, que diferencia espécies de acordo com o número de similaridade fenotípicas; e sistemática molecular, que diferencia espécies de acordo com marcadores moleculares. Contudo, a combinação desta abordagem polifásica torna mais concisa a descrição desses microrganismos (ZUCCHI et al., 2012).

3.5 Esponjas marinhas

As esponjas constituem o filo Porifera, sendo os metazoários (animais) evolutivamente menos derivados que têm existido por 700 – 800 milhões de anos (HENTSCHEL et al., 2002). Apesar de não possuírem órgãos, seu tecido conjuntivo é bem desenvolvido devido à presença de células que realizam várias funções. Este alto grau de independência celular faz com que o corpo das esponjas lembre uma colônia de protozoários. Estes organismos são sésseis e possuem um plano corporal incomum construído ao redor de um sistema de canais de água (RUPPERT; BARNES, 1996).

Existem quatro classes distintas de esponjas, denominadas: *Calcarea*, *Demospongiae*, *Hexactinellida* e *Homoscleromorpha* (FIESELER et al., 2004; van SOEST et al., 2015). De acordo com bancos de dados atuais como WPD (*World Porifera Database*), existem 8644 espécies válidas de esponjas catalogadas e reconhecidas, de um total estimado de 15.000 espécies (CUSTÓDIO; HAJDU, 2011; VAN SOEST et al., 2015). No Brasil, existem cerca de 350 espécies descritas, sendo 295 de ambiente marinho e 55 de ambientes aquáticos continentais (CUSTÓDIO; HAJDU, 2011; van SOEST et al., 2015). No Arquipélago de São Pedro e São Paulo algumas espécies raras de Porifera já foram catalogadas: *Astero pusniger*, *Dercitus luteus*, *Timea scecircm*, *Discodermia dissoluta*, *Hemimycale insularis*, *Axinyssa* sp., *Niphates* sp., *Cacospongia* sp., *Dysidea etheria*, *Darwinella rosace* (MORAES, 2011).

De forma geral as esponjas são encontradas preferencialmente em águas rasas, sendo abundantes em todos os mares, desde ambientes tropicais como o Mar do Caribe até os pólos. Utilizam como substrato de fixação rochas, conchas, madeiras submersas ou corais. Especula-se que a coloração variada e de forte intensidade seja conferida pela microbiota residente que age com um mecanismo de proteção à radiação solar ou sinal de aviso a predadores (RUPPERT; BARNES, 1996).

Anatomicamente, a superfície do corpo de esponjas é perfurada, com vários poros denominados óstios, que se abrem dentro da cavidade interior, denominado espongiocele ou átrio. O ósculo é uma grande abertura para o exterior, por onde sai a corrente de água que entra pelos óstios. A superfície corporal do organismo é revestida de células achatadas, conhecidas como pinacócitos. Os pinacócitos basais são responsáveis pela fixação ao substrato através da produção de secreção. Cada poro da esponja é formado por uma célula denominada porócito, que apresenta forma tubular e liga o exterior à cavidade interna. A cavidade formada pelos porócitos forma os óstios que podem se contrair, abrindo e fechando os poros (LANGENBRUCH; SCALERA-LIACI, 1986). O esqueleto do animal é formado por espículas calcárias, espículas silicosas, fibras de esponginasprotéicas ou uma combinação das duas últimas; essas formas são utilizadas para classificação e identificação das esponjas (KOEHL, 1982) (Figura 1).

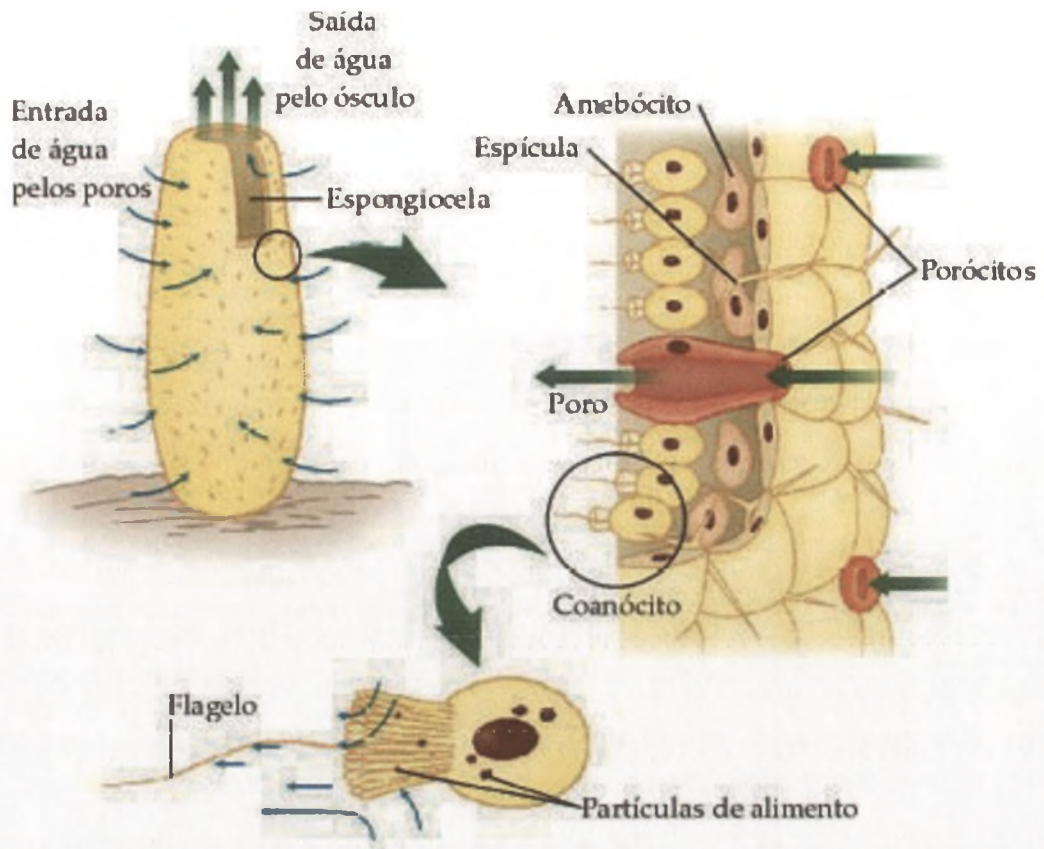


Figura 1 - Esquema básico da estrutura corporal de Porifera (CERÁVOLO, 2011)

O alimento das esponjas é captado por meio de células especializadas (coanócitos), que movimentam a água por meio de movimentação flagelar (REISWIG, 1971) (Figura 1). A água que flui através do corpo da esponja carrega alimento e oxigênio, além de remover detritos e dispersar as larvas durante o ciclo reprodutivo. Uma esponja com massa corpórea de 1 kg é capaz de bombear mais de 10.000 L de água/dia, sendo a velocidade do fluxo controlada por fechamento e abertura do ósculo (CUSTÓDIO; HAJDU, 2011). Desta forma, estes organismos agem como filtros, fagocitando pequenas moléculas, como matéria orgânica coloidal, e outras partículas de até 50 μm que podem incluir bactérias, dinoflagelados e outros seres planctônicos (REISWIG, 1971). Tais características tornam estes organismos extremamente importantes nos ecossistemas em que se encontram.

3.6 Associação entre esponjas e microorganismos e o potencial destes na produção de compostos bioativos

Durante a história evolutiva, esponjas desenvolveram potentes mecanismos de proteção química contra competidores e predadores, bem como contra microrganismos infecciosos (THOMAS et al., 2010). Devido às características adquiridas em seu curso evolutivo, estes animais sésseis e filtradores têm sido explorados biotecnologicamente, sendo fonte 40% de todos os compostos naturais marinhos, alguns dos quais em estágios finais para aprovação comercial (HAEFNER, 2003).

É notável a grande diversidade de microrganismos associados a esponjas. Entretanto, a especificidade da interação ainda é intrigante, pois pouco se conhece dessa complexa sinalização química. O conhecimento acerca da interação esponjas-microrganismos provém de pesquisas da década de 70, que indicaram a presença de certas bactérias abundantes nos seus tecidos. Porém, esta diversidade é específica e totalmente distinta de outros habitats marinhos (SIMISTER et al., 2012).

Uma pesquisa realizada por Webster e colaboradores (2010) revelou a existência de aproximadamente 3.000 unidades taxonômicas em nível de gênero, na espécie de esponja tropical *Rhopaloeidesodorabile* sp. Estes dados sugerem que a diversidade bacteriana, contida no corpo de esponjas marinhas, é a maior encontrada entre hospedeiros invertebrados. Além disso, a biomassa dos microrganismos abrigados representa 50 a 60% da biomassa total (THOMAS et al., 2010). Em outro estudo relacionado à ecologia microbiana molecular, foi observado que a comunidade microbiana associada às esponjas consiste de 10 filos bacterianos, além de membros do domínio *Archaea*, e eucariotos, como fungos e microalgas (WANG, 2006). Um estudo realizado por Webster e Taylor (2012), estimou que 9374 sequências microbianas depositadas em bancos de dados públicos são derivadas de estudos em esponja, apresentando uma predominância de *Proteobacteriae* e *Actinomicetales*. A análise de amostras de esponjas por técnicas independentes de cultivo mostrou que a maioria dos microrganismos associados são metabolicamente ativos dentro de seus hospedeiros (WEBSTER et al., 2010).

A distribuição espacial de microrganismos dentro dos tecidos das esponjas parece ser muito específica; alguns grupos bacterianos habitam as papilas,

enquanto outros ocupam o interior do córtex e a região de células especializadas em captura de alimentos, como os coanossomos. A relevância desta relação reflete na saúde e sobrevivência das esponjas (WEBSTER et al., 2012). É atribuída à microbiota associada e presente em poríferos a função de aquisição de nutrientes, estabilização do esqueleto e a produção de metabólitos secundários. Esta hipótese foi proposta inicialmente por Haygood e colaboradores (1999), que investigaram a população de células microbianas dentro de amostras de esponjas segundo a produção de compostos naturais pelos microorganismos associados. Assim, características relacionadas a ciclos biogeoquímicos realizadas pela microbiota associada em esponjas, como o ciclo do nitrogênio (HOFFMANN et al., 2009), desnitrificação e oxidação anaeróbica do amônio (Anammox), já foram reportadas.

Além da ciclagem de nutrientes, esses microorganismos podem ser responsáveis pela biossíntese de vitamina B12 (eucariotos somente adquirem esta vitamina via alimentação), um importante co-fator de diversas vias metabólicas (SIEGL et al., 2011).

O corpo das esponjas representa o nicho marinho de maior importância para bioprospecção de micro-organismos produtores de compostos anti-câncer e metabólitos secundários de interesse biotecnológico. Estima-se que 37% do total de compostos microbianos de origem marinha são obtidos a partir de esponjas (LEAL et al., 2012). Desses, os maiores grupos de microorganismos associados a esponjas conhecidos por produção de metabólitos secundários de importância farmacêutica incluem α , β , γ , δ - *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Cyanobacteria*. Porém, actinobactérias são responsáveis por 47% destes metabólitos bioativos produzidos (THOMAS et al., 2010).

Dentre as quatro classes de esponjas, *Demospongiae* é a maior fonte de compostos de interesse farmacêutico e biotecnológico. Esta classe é também a mais ampla, pois representa 90% das espécies de esponjas e inclui a maioria das formas popularmente conhecidas. Do total de 92 famílias pertencentes à classe *Demospongiae*, 26 famílias já foram identificadas por produzirem compostos bioativos de origem microbiana com importância para medicina (THOMAS et al., 2010). As ordens *Halichondrida*, *Poecilosclerida*, *Dictyoceratida* e *Verongida* são de maior importância para bioprospecção, sendo amplamente distribuídas na costa brasileira (THOMAS et al., 2010; CUSTÓDIO; HAJDU, 2011).

Um dos grupos de bactérias que tem sido isolados e que tem apresentado grande potencial de produção de compostos bioativos refere-se às actinobactérias.

Mais recentemente, a descoberta de produtos naturais em ambiente marinho tem crescido exponencialmente, o que tem impulsionado o esforço de pesquisas neste habitat devido às classes inéditas dos compostos encontrados (HARDOIM et al., 2009). Além do mais, a necessidade de identificação de novas classes de compostos bioativos é emergente, pois atualmente cerca de 90% de todos os compostos bioativos descritos na literatura possuem a estrutura química já conhecida ou já caracterizada (BÉRDY, 2005).

Nesta perspectiva, os atuais bancos de dados descrevem entre 20.000 a 25.000 produtos antimicrobianos, dos quais aproximadamente 46% são produzidos por *Streptomyces*. Por esta razão a procura por gêneros de actinobactérias raras tem sido o objetivo de novos programas de desenvolvimento de drogas ou outros compostos bioativos, através da exploração de ambientes inexplorados ou pouco explorados, além de novas técnicas de cultivo (TIWARI; GUPTA, 2012; GOODFELLOW; FIEDLER, 2010).

Estima-se que as moléculas bioativas produzidas por actinobactérias e outros microrganismos vêm evoluindo desde os primórdios da vida primitiva (BALTZ, 2006b). Este fato explicaria a enorme diversidade molecular de metabólitos microbianos, porém, protocolos de *screening* e de identificação dos compostos produzidos por estes microrganismos exigem metodologias complexas, trabalhosas e onerosas. Grandes progressos em automação têm melhorado as metodologias para este propósito com novos protocolos que utilizam cromatografia acoplada (ou não-acoplada) a espectrometria robotizada para identificação das moléculas (BÉRDY, 2005).

Devido ao custo para triagem de novas moléculas de origem microbiana, a indústria farmacêutica tem empregado métodos de síntese artificial, em que milhões de novos compostos orgânicos são produzidos, mas somente uma pequena parte destes (aproximadamente 0,001 %) se tornaram drogas aceitas. Metabólitos de origem microbiana são mais vantajosos, uma vez que a cada 10.000 compostos, aproximadamente 0,3 % são aprovados para uso como produtos terapêuticos (BÉRDY, 2005).

Vários exemplos de moléculas bioativas com as mais diversas aplicações são descritas na literatura. No Brasil, compostos isolados de diferentes esponjas obtidas

em São Sebastião/SP mostraram atividades citotóxicas específicas contra células tumorais e contra o vírus causador da síndrome respiratória aguda severa (SARS) (LIRA et al., 2007). Seleghime e colaboradores (2007) identificaram moléculas com propriedades antibióticas contra diversas cepas de microrganismos patogênicos. Essas moléculas são pertencentes a classes já conhecidas de drogas, como penicilina, cefalosporina, estreptomicina e vancomicina. Alguns compostos extraídos de actinobactérias marinhas têm sido identificados como antitumorais (bleomicina, dactinomina, doxorubicina e estaurosporina, resistoflavina, marinomicina A, ediriamida C) (BHATNAGAR et al., 2010).

Além de aplicação farmacêutica, atividades agrícolas começaram a utilizar alguns compostos naturais como pesticidas, a exemplo da Avermectina, Monensina e Bialaphos que são os compostos de origem microbiana mais difundidos neste grupo (BÉRDY, 2005).

Contudo, o potencial metabólico de actinobactérias marinhas é uma área promissora a ser explorada para o mercado agroquímico, devido à inestimável diversidade ainda pouco estudada de compostos bioativos extraídos destes microrganismos para aplicação na indústria agrícola.

3.7 *Aplysina fulva*: distribuição, descrição taxonômica e potencial biotecnológico

A esponja marinha *Aplysina fulva* (PALLAS, 1766) (Figura 2), pertencente à classe *Demospongiae*, e à ordem *Verongiida*; é amplamente distribuída ao longo do Mar do Caribe (Flórida, Bahamas, Ilhas Virgens, San Martin, Barbados, Cuba, Panamá, Colômbia, Curaçao, Bonaire e Venezuela) e ao longo do Oceano Atlântico Sul, cobrindo grande parte da costa do Brasil (Ceará, Rio Grande do Norte, Fernando de Noronha, Arquipélago de São Pedro e São Paulo, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo). É muito abundante em costões expostos à luz, entre colônias de *Palythoa* sp. (Filo *Cnidaria*), dentro de locas ou em fundos cobertos de areia (MORAES, 2011).

Os indivíduos são caracterizados pela coloração amarela a marrom, com o interior mais claro. Porém, após a coleta, tipicamente, a coloração muda para marrom escura a arroxeada. Possui forma ereta, com ramos aproximadamente cilíndricos, sólidos, com 3 a 5 cm de diâmetro e até 50 cm de altura, projetando-se

de uma base maciça. Não possuem espículas e a superfície é finamente conulosa, atravessada pelas extremidades das fibras de esponjina. Possuem ósculos circulares, elevados, com 1 a 3 mm de diâmetro, dispersos aleatoriamente nas laterais dos ramos. A consistência é macia e flexível. O esqueleto de fibras de esponjina estratificadas é de cor dourada com diâmetro de 53 a 106 μm , com medula clara ou escura de diâmetro entre 22 e 47 μm , formando um retículo tridimensional com malhas poligonais irregulares (PINHEIRO et al., 2007; MURICY; HAJDU, 2006).



Figura 2 - Esponja marinha *Aplysina fulva*. (Fotografada por G. Muricy)

Em um estudo para caracterizar a diversidade de microorganismos do domínio *Bacteria*, Haridoim et al. (2009) verificou que amostras do mesohilo de *A. fulva* possuem alta abundância de células bacterianas, abrangendo uma gama de diferentes tipos morfológicos. Além disso, foi verificado que a contagem de microorganismos heterotróficos cultiváveis mostraram números bacterianos obtidos a partir de *A. fulva* superior a água do mar em mais de duas ordens de grandeza. Foi

verificado também neste estudo que o filo *Actinobacteria* é um dos mais predominantes com alta abundância relativa presente na microbiota associada à esponja.

Aplysina fulva é descrita na literatura científica como organismo produtor de compostos bioativos como lectinas com propriedades hemoaglutinantes e derivados de bromotirosina com atividade citotóxica e antimicrobiana o que o tornam um importante objeto de estudo (PINHEIRO et al., 2007; MURICY; HAJDU, 2006).

Referências

ALAIN, K.; QUERELLOU, J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. **Extremophiles**, Amsterdam, v.13, p. 583-594, 2009.

ALANIO, A.; BERETTI, J.L.; DAUPHIN, B.; MELLADO, E.; QUESNE, G.; LACROIX, C.; AMARA, A.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; BOUGNOUX, M.E. MALDI-TOF Mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. **Clinical Microbiology and Infection**, Boston, v. 17, n. 5, p. 750-755, 2010.

ASHFORTH, E.J.; FU, C.; LIU, X.; DAI, H.; SONG, F.; GUO, H.; ZHANG, L. Bioprospecting for antituberculosis leads from microbial metabolites. **Natural Product Reports**, London, v. 27, n. 1, p. 1709-1719, 2010.

BALTZ, R.H. Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics and other secondary metabolites in actinomycetes. **SIM News**, Amsterdam, v. 56, p. 148-160, 2006a.

_____. Marcel faber roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 33, n. 7, p. 507-513, 2006b.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites a personal view. **Journal of Antibiotics**, Basel, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BERNAN, S.; GREENSTEIN, M.; MAIESE, W.M. Marine microorganisms as a source of new natural products. **Advances in Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 43, p. 57-90, 1997.

BHATNAGAR, I.; KIM, S.K. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 10, p. 2673-701, 2010.

BREDHOLDT, H.; GALATENKO, O.A.; ENGELHARDT, K.; FJAERVIK, E.; TEREKHOVA, L.P.; ZOTCHEV S.B. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. **Environmental Microbiology**, Dordrecht, v. 9, n. 11, p. 2756-2764, 2007.

BULINA, T.I.; ALFEROVA, I.V.; TEREKHOVA, L.P. A novel approach to isolation of actinomycetes involving irradiation of soil samples with microwaves. **Microbiology**, New York, v. 66, p. 231-234, 1997.

CERÁVOLO, M. **Zoologia e embriologia**. 2011. Disponível em: <<https://nosomeioprinteiro.wordpress.com/2011/11/30/porifero/11/30/2011>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

COLWELL, R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 104, n. 1, p. 410-433, 1970.

CONNON, S.A.; GIOVANNONI, S. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 3878-3885, 2002.

COPPING, L.G.; DUKE, S.O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 63, n. 6, p. 524-554, 2007.

CUSTÓDIO, M.R.; HAJDU, E. Checklist of Porifera from São Paulo State, Brazil. **Biota Neotropical**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 427-444, 2011.

DAYAN, F.E.; DUKE, S.O. Natural compounds as next-generation herbicides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, n. 3, p. 1090-1105, 2014.

DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. Herbicidal agents from actinomycetes against selected crop plants and weeds. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 24, n. 6, p. 521-529, 2010.

DUKE, S.O. Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. **Pest Management Science**, Catonsville, v. 61, n. 1, p. 211-218, 2005.

DUKE, S.O.; DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; RIMANDO, A.M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, Hoboken, Catonsville, v. 40, n. 2, p. 99-111, 2000.

DUPONT, S.; CARRE-MLOUKA, A.; DOMART-COULON, I.; VACELET, J.; BOURGUET-KONDRACKI, M.L. Exploring cultivable bacteria from the prokaryotic community associated with the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea*. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 160-174, 2014.

DURBIN, R.D. Techniques for the observation and isolation of soil microorganisms. **Botanical Review**, New York, v. 27, n. 1020, p. 522-560, 1961.

FENICAL, W.; JANSEN, P.R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 2, p. 666-673, 2006.

FIGESELER, L.; HORN, M.; WAGNER, M.; HENTSCHEL, U. Discovery of the novel candidate Phylum "*Poribacteria*" in marine sponges. **Applied and Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 70, n. 6, p. 3724-3732, 2004.

FORTÚN, S.S.; MARVÁ, F.; D'ORS, A. Inhibition of growth and photosynthesis of selected green microalgae as tools to evaluate toxicity of dodecylethyldimethylammonium bromide. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 229-234, 2008.

GARCIA, D.E.; BAIDOO, E.E.; BENKE, P.I.; PINGITORE, F.; TANG, Y.J.; VILLA, S., KEASLING, J.D. Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 11, n.1, p. 233-239, 2008.

GOODFELLOW, M. *Streptomyces staurosporininus* sp. nov., a staurosporine-producing actinomycete isolate from a hay meadow soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, n. 4, p. 966-970, 2012.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H.P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 98, n. 2, p. 119-42, 2010.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

HARDOIM, C.C.P.; COSTA, R.; ARAUJO, F.V.; HAJDU, E.; PEIXOTO, R.; LINS, U.; VAN ELSAS, J.D. Diversity of bacteria in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 10, p. 3331-3343, 2009.

HAUSBECK, M.K.; LAMOUR, K.H. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 12, p.1292-1303, 2004.

HAYAKAWA, M.; IINO, H.; TAKEUCHI, S.; YAMAZAKI, T. Application of a method incorporating treatment with chloramine-T for the selective isolation of *Streptosporangiaceae* from soil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 84, n. 6, p. 599-602, 1997.

HAYGOOD, M.G.; SCHMIDT, E.W.; DAVIDSON, S.K.; FAULKNER, D.J. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Totowa, v. 1, n.1, p. 33-43, 1999.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A.B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B.S. Molecular evidence for an uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4431-4440, 2002.

HOFFMANN, F.; RADAX, R.; WOEBKEN, D.; HOLTAPPELS, M.; LAVIK, G.; RAPP, H.T. Complex nitrogen cycling in the sponge *Geodiabarretti*. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 11, n. 9, p. 2228-2243, 2009.

HOZZEIN, W.N.; IBRAHIM, M.A.; RABIE, A.W. A new preferential medium for enumeration and isolation of desert actinomycetes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 24, n. 8, p. 1547-1552, 2008.

JENSEN, P.R.; GONTANG, E.; MAFNAS, C.; MINCER, T.J.; FENICAL, W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 7, n. 7, p. 1039-1048, 2005.

JIANG, Y.; CAO, Y.; ZHAO, L.; WANG Q.; JIN, R.; HE, W.; XUE, Q. Ultrasonic treatment of soil samples for actinomycete isolation. **Acta Microbiologica Sinica**, New York, v. 50, n. 8, p. 1094-1097, 2010.

KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 2, p.141-150, 2004.

KIM, C.J; LEE, K.H; SHIMAZU, A.; KWON, O.S.; PARK, D.J. Isolation of rare actinomycetes in various types of soil. **Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 23, p. 36-42, 1995.

KOCABAS, H. U. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 342-347, 2012.

KOEHL, M.A.R. Mechanical design of spicule-reinforced connective tissue: stiffness. **Experimental Biology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 239-267, 1982.

KONISHI, Y.; KIYOTA, T.; DRAGHICI, C.; GAO, J.M.; YEBOAH, F.; ACOCA, S.; JARUSSOPHON, S.; PURISIMA, E. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 79, n. 1, p. 1187-1197, 2007.

KOVACEVIC, G.; JELENCIC, B.; KALAFATIC, M.; LJUBESIC, N. *Chlorella* test. **Periodicum Biologorum**, Zagreb, v. 110, n. 4, p. 373-374, 2008.

LANGENBRUCH, P.F.; SCALERA-LIACI, L. Body structure of marine sponges: IV. Aquiferous system and choanocyte chambers in *Haliclona elegans*. **Zoornorphology**, New York, v. 106, n. 4, p. 205-211, 1986.

LAZZARINI, A.; CAVALETTI, L.; TOPPO, G.; MARINELLI, F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 79, n. 3, p. 399-405, 2001.

LEAL, M.C.; PUGA, J.; SERÔDIO, J.; GOMES, N.C.; CALADO, R. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades—where and what are we bioprospecting. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2012.

- LI, R.Y.; WU, X.M.; YIN, X.H.; LONG, Y.H.; LI, M. Naturally produced citral can significantly inhibit normal physiology and induce cytotoxicity on *Magnaporthe grisea*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.118, n. 1, p. 19-25, 2015.
- LI, Y.; SUN, Z.; ZHUANG, X.; XU, L.; CHEN, S.; LI, M. Research progress on microbial herbicides. **Crop Protection**, Oxon, v. 22, n. 1, p. 247-252, 2003.
- LIRA, S.P.; SELEGHIM, M.H.R.; WILLIAMS, D.E.; MARION, F.; HAMILL, P.; JEAN, F.; ANDERSEN, R.J.; HAJDU, E.; BERLINCK, R.G.S. A SARS-coronavirus 3CL protease inhibitor isolated from the marine sponge *Axinellacorrugata*: structure elucidation and synthesis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 440-443, 2007.
- LU, W.; GU, D.; CHEN, X.; XIONG, R.; LIU, P.; YANG, N.; ZHOU, Y. Application of an oligonucleotide microarray-based nano-amplification technique for the detection of fungal pathogens. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 48, n. 10, p. 1507-1514, 2010.
- MA, J.; XU, L.; WANG, S.; ZHENG, R. Z.; JIN, S.; HUANG, S.; HUANG, Y. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San, Diego, v. 51, n. 2, p. 128-132, 2002.
- MAGARVEY, N.A.; KELLER, J.M.; BERNAN, V.; DWORKIN, M.; SHERMAN, D.H. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 12, p. 7520-7529, 2004.
- MALDONADO, L.A.; STACH, J.E.; PATHOM-AREE, W.; WARD, A.C.; BULL, A.T.; GOODFELLOW, M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 87, p. 11-18, 2005.
- MAYR, E. **Populations, species, and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1970. 453 p.
- MCDONALD, L.A.; BARBIERI, L.R.; CARTER, G.T., KRUPPA, G.; FENG, X.; LOTVIN, J.A.; SIEGEL, M.M. FTMS structure elucidation of natural products: application to muraymycin antibiotics using ESI multi-CHEF SORI-CID FTMS_n, the top-down/bottom-up approach, and HPLC ESI capillary-skimmer CID FTMS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 75, n. 3, p. 2730-2739, 2003.
- McGINNIS, M.R. Recent taxonomic developments and changes in medical mycology. **Annual Review in Microbiology**, London, v. 34, n. 1, p. 109-135, 1980.
- MORAES, F.C. **Esponjas das ilhas oceânicas brasileiras**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011. 252 p. (Série Livros, 44).

MURICY, G.; HAJDU, E. **Porifera brasiliis**: guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006. 104 p. (Série Livros, n. 17).

NICOLAS, G.G.; HIROYUKI, N. Growth and photosynthesis inhibition by agricultural pesticides in three freshwater microalgae. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 144-151, 2002.

PALLAS, P.S. **Elenchus zoophytorum sistens generum adumbrationes generaliores et specierum cognitarum succintas descriptiones, cum selectis auctorum synonymis**. Hagae: Petrum, 1766. 451 p.

PATHOM-AREE, W.; STACH, J.E.M.; WARD, A.C.; HORIKOSHI, K.; BULL, A.T.; GOODFELLOW, M. Diversity of actinomycetes isolated from challenger deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. **Extremophiles**, Amsterdam, v. 10, n.3, p. 181-189, 2006.

PINHEIRO, U.S.; HAJDU, E.; CUSTÓDIO, M.R. *Aplysina nardo* (Porifera, Verongida, Aplysinidae) from the Brazilian coast with description of eight new species. **Zootaxa**, Auckland, v. 1, n. 51, p. 1609, 2007.

PRADO, R.; GARCÍA, R.; RIOBOO, C.; HERRERO, C; ABALDE, J.; CID, A. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. **Environment International**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 240-247, 2009.

RACHNIYOM, H.; JAENAKSORN, T. Effect of soluble silicon and Trichoderma harzianum on the in vitro growth of *Pythium aphanidermatum*. **Journal of Agricultural Technology**, Tehran, v.4, n. 2, p. 57-71, 2008.

REISWIG, H.M. In situ pumping activities of tropical Demospongiae. **Marine Biology**, Heidelberg, v. 9, n. 1, p. 38-50, 1971.

RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. **Natural products for pest management**. Washington: American Chemical Society 2006. 21 p. (Symposium Series, 927).

ROSSMAN, A.Y.; PALM-HERNANDÉZ, M.E. Systematics of plant pathogenic fungi: why it matters. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 10, p. 1376-1386, 2008.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996. 1028 p.

SANODIYA, B.S.; THAKUR, G.S.; BAGHEL, R.K.; PANDEY, A.K.; PRASAD, G.B.K.S.; BISEN, P.S. Isolation and characterization of tenuazonic acid produced by *Alternaria alternata*, a potential bioherbicidal agent for control of *Lantana Camara*. **Journal of Plant Protection Research**, Berlin, v. 50, n. 2, p. 133-139, 2010.

SIEGL, A.; KAMKE, J.; HOCHMUTH, T.; PIEL, J.; RICHTER, M.; LIANG, C. Single-cell genomics reveals the lifestyle of *Poribacteria*, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. **ISME Journal**, London, v. 5, n. 1, p. 61-70, 2011.

- SUN, W.; DAI, S.; JIANG, S.; WANG, G.; LIU, G.; WU, H.; LI, X. Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 98, p. 65-75, 2010.
- THOMAS, T.R.A.; KAVLEKAR, D.P.; LOKABHARATHI, P. Marine drugs from sponge-microbe association: a review. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 4, p. 1417-68, 2010.
- TIWARI, K.; GUPTA, R.K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 32, n. 2, p. 108-132, 2012.
- VALENTE, P.; RAMOS, J.P.; LEONCINI, O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 949-958, 1999.
- van REGENMORTEL, M.H.V. Concept of virus species. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 1, n. 4, p. 263-266, 1992.
- van SOEST, R.W.M.; BOURY-ESNAULT, N.; HOOPER, J.N.A.; RÜTZLER, K.; DE VOOGD, N.J.; ALVAREZ DE GLASBY, B.; HAJDU, E.; PISERA, A.B.; MANCONI, R.; SCHOENBERG, C.; JANUSSEN, D.; TABACHNICK, K.R.; KLAUTAU, M.; PICTON, B.; KELLY, M.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; DÍAZ, M.-C.; CÁRDENAS, P. **World Porifera database**. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/porifera> on 2015-09-12>. Acesso em: 13 ago. 2015.
- VARTOUKIAN, S.R.; PALMER, R.M.; WADE, W.G. Strategies for culture of "unculturable" bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 309, n. 1, p. 1-7, 2010.
- VILLAS-BÔAS, S.G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, Hoboken, v. 24, n. 3, p. 613-646, 2005.
- WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 33, n. 7, p. 545-551, 2006.
- WEBSTER, N.S.; TAYLOR, M.W. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. **Environmental Microbiology**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 335-46, 2012.
- WEBSTER, N.S.; TAYLOR, M.W.; BENHAM, F.; LÜCKER, S.; RATTEI, T.; WHALAN, S. Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. **Environmental Microbiology**, Dordrecht, v. 12, n. 8, p. 2070-2082, 2010.
- WEYLAND, H. Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. **Nature**, London, v. 223, p. 858, 1969.

WOLF, D.; SIEMS, K. Burning the hay to find the needle: data mining strategies in natural product dereplication. **Chimia**, Bern, v. 61, n. 6, p. 339-345, 2007.

ZUCCHI, T.D.; KIM, B.-Y.; KSHETRIMAYUM, J.D.; WEON, H.-Y.; KWON, S.-W.; GOODFELLOW, M. *Streptomyces brevispora* sp. nov. and *Streptomyces laculatispora* sp. nov., novel actinomycetes isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, n. 3, p. 478-483, 2012.

4 DIVERSIDADE DE ACTINOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE COMPOSTOS FUNGICIDAS ISOLADAS DE *APLYSINA FULVA* DO ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO

Resumo

Este estudo descreve a diversidade de actinobactérias isoladas da esponja marinha *Aplysina fulva* e o potencial destes micro-organismos como produtores de metabólitos bioativos com propriedades fungicidas. Um total de 21 actinobactérias foram isoladas com a utilização de meios seletivos para o cultivo destes microorganismos. Análises filogenéticas baseadas no sequenciamento parcial do gene que codifica para o rRNA 16S mostrou que foram isoladas bactérias pertencentes a oito gêneros do filo *Actinobacteria*: *Kocuria*; *Citricoccus*; *Terrabacter*; *Gordonia*; *Agrococcus*; *Tsukamurella*; *Brevibacterium* e *Streptomyces*. Os extratos bruto de todos os isolados foram testados quanto a sua atividade fungicida, contra os fungos fitopagênicos: *Pythium aphanidermatum*; *Phytophthora capsici* e *Magnaporthe grisea*. Os extratos bruto de 43% dos isolados mostraram atividade fungicida para, pelo menos, um dos patógenos. Os perfis químicos dos extratos bruto dos isolados com bioatividade positiva foram similares mesmo entre gêneros diferentes. Isto sugere que espécies diferentes produzam compostos similares que possam atuar como defesa química da esponja. Contudo, este estudo demonstra que parte das actinobactérias cultiváveis associadas à *Aplysina fulva* possui um grande potencial biotecnológico cujos compostos com atividade fungicida para patógenos agrícolas podem ser futuramente utilizados no desenvolvimento de novos agroquímicos.

Palavras-chave: Metabólitos secundários; Fungicidas; *Pythium aphanidermatum*; *Phytophthora capsici*; *Magnaporthe grisea*; Agroquímicos

Abstract

This study describes the diversity of actinobacteria associated with the marine sponge *Aplysina fulva* and their potential as producers of bioactive compounds with fungicidal and herbicidal properties. In this study, a total of 21 actinomycetes were isolated with the use of selective media. Phylogenetic analyzes based on partial sequencing of the gene encoding for 16S rRNA showed that these microorganisms belong to eight Actinobacteria genera, including *Kocuria*, *Citricoccus*, *Terrabacter*, *Gordonia*, *Agrococcus*, *Tsukamurella*, *Brevibacterium* and *Streptomyces*. The extracts of all isolates were tested for the production of secondary metabolites with fungicidal properties against the following phytopathogenic fungi: of *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* and *Magnaporthe grisea*. The crude extract of 43% of the isolates showed fungicidal activity for at least one of the pathogens. The chemical profiles of the actinobacteria extracts with positive bioactivity were similar even among different genus. This suggests that different species produce similar compounds that can act as chemical defense sponge. However, this study shows that part of actinobacteria associated with *Aplysina fulva* has a great biotechnological potential whose compounds with fungicidal activity for agricultural pathogens can be further used in the development of new agrochemicals.

Keywords: Secondary metabolites; Fungicides; *Pythium aphanidermatum*; *Phytophthora capsici*; *Magnaporthe grisea*; Agrochemicals

4.1 Introdução

Esponjas pertencem ao filo *Porifera* que consistem em organismos bentônicos e sésseis que ocorrem primariamente e em maior abundância em ambientes marinhos, embora existam poucas espécies de água doce (HOOPER; VAN SOEST, 2002). São encontradas frequentemente aderidas a substratos como rochas, sedimentos e conchas de bivalves, tanto em profundidades rasas até zonas abissais (DUPONT et al., 2014). Estes animais são os metazoários mais antigos, com um corpo estruturado em um único plano constituído de sistemas de canais de água por onde se alimentam e respiram por filtração. Devido à capacidade de bombeamento de milhares de litros de água por dia a principal fonte de alimento das esponjas são microorganismos e pequenas partículas orgânicas que estão presentes na água periférica filtrada (PILE et al., 1996). Este fato explica a alta densidade de microorganismos presentes nas camadas internas do corpo das esponjas (meso-hilo) (VACELET; DONADEY, 1977), e indica que exista algum processo que favoreça alguns filos de procaríotos aos quais estão estabelecidos em uma interação microorganismo/esponja cuja origem remonta a um período de 550 milhões de anos de co-evolução (LI et al., 1998; BRUSCA et al., 2002). Dentre os filos de *bacteria* frequentemente encontrados nesta interação estão presentes as actinobactérias (DUPONT et al., 2014).

O filo *Actinobacteria* é o maior clado filogenético de *bactéria*. São microorganismos Gram-positivos com alto conteúdo G+C na constituição genômica (SUN et al., 2010) e são largamente distribuídos em habitats terrestres e marinhos apresentando importantes fontes de compostos bioativos que incluem antibióticos, agentes antitumorais, enzimas e inibidores enzimáticos (HAYAKAWA et al., 2000; TERKINA et al., 2002; SHIROKIKH; MERZAEVA, 2005; WARD, BORA 2006). Devido a esta grande capacidade de produção de metabólitos bioativos cerca de dois-terços de todos os compostos naturais bioativos, como antibióticos por exemplo, são de origem de actinobactérias (BULL, 2004). Contudo, na última década a taxa de descobertas de produtos naturais produzidos por *Actinobacteria* de ambiente terrestre teve uma expressiva queda devido a grande exploração já

realizada neste nicho, o que levou a prospecção do ambiente marinho como fonte de novas moléculas (SUN et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi verificar a diversidade de actinobactérias produtoras de metabólitos secundários bioativos com ação anti-fúngica, para fitopatógenos de importância agrícola como *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum* e *Magnaporthe grisea*. Acredita-se que actinobactérias de ambiente marinho possam ser uma valiosa fonte de moléculas bioativas com potencial biotecnológico para a indústria agroquímica. Para tal propósito, foram coletadas amostras da esponja marinha *Aplysina fulva*, uma das espécies de esponjas mais prevalentes no litoral Brasileiro, no remoto e prístino Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Local de amostragem

O Arquipélago de São Pedro e São Paulo é uma pequena formação rochosa situado na Zona de Fratura de São Paulo, resultado do desenvolvimento de uma falha formada a partir do deslocamento paralelo de porções do fundo oceânico (THURMAN, 1997). Localizado nas coordenadas 0°55'N – 29°21'W, o arquipélago está distante 1010 km a NE da cidade de Natal (RN) (MORAES, 2011) (Figura 3).



Figura 3 - Localização do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, situado no Oceano Atlântico Equatorial ($0^{\circ}54'57''N$; $29^{\circ}20'41''W$) inserido na Zona de Fratura de São Paulo. Ponto e flexa em vermelho indicam a localização (fonte: Google Earth)

É um dos menores e mais isolados arquipélagos do planeta, com cerca de 420 metros de largura, 18 metros no ponto mais alto (CAMPOS et al., 2009). Esta formação rochosa ainda instável encontra-se isolada, numa região do Atlântico Norte com profundidade que variam de 2000 a 4000 m (MORAES, 2011). Possui origem geológica única formada por rochas plutônicas, diferente de todas as ilhas oceânicas do atlântico cuja origem é vulcânica (MELSON et al., 1972). O arquipélago encontra-se em uma área de circulação oceânica complexa, sendo banhado por duas correntes: Corrente Sul Equatorial, com deriva para Oeste, entre 0 e 40 metros de profundidade, e pela Subcorrente Equatorial, com deriva para Leste, entre 40 e 150 metros de profundidade (TRAVASSOS et al., 1999).

Atualmente São Pedro e São Paulo é uma Área de Proteção Ambiental (APA), que desde julho de 1998 possui uma estação científica, mantida pela Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (SECIRM).

A esponja marinha foi coletada na face leste do Arquipélago de São Pedro e São Paulo ($0^{\circ}54'57''N$; $29^{\circ}20'41''W$) (Figura 5). Este foi o primeiro registro de coleta de esponjas para isolamento de microorganismos nesta região do remoto

arquipélago. Devido ao relativo afastamento da ilha, o local escolhido para coleta está sobre influência de correntes oceânicas com pouca influência do micro-habitat periférico da costa da ilha (Figura 4).



Figura 4 - Localização do ponto de coleta da esponja marinha (círculo vermelho) situado na face leste do Arquipélago de São Pedro e São Paulo

A coleta da esponja marinha ocorreu em agosto de 2013, junto à expedição número 385 do Programa Pró-Arquipélago/CNPq/CECIRM/Marinha do Brasil.

Foram realizados mergulhos com utilização de equipamento autômato em 7 pontos ao entorno do arquipélago com a função de reconhecimento do local, localização de esponjas e familiarização de correntes marinhas. Após a localização da esponja foram armazenados 5 L de água do entorno do sítio com utilização de uma garrafa coletora tipo *Van Dorn* para mensuração de parâmetros físico-químicos do local da amostragem. Estes parâmetros foram imediatamente mensurados com uma sonda *Horiba-Multi Water Quality Cheker- U-52 Series*. As amostras foram coletadas em profundidade de 20 m e imediatamente armazenadas dentro de sacos plásticos estéreis e hermeticamente fechados. Após o transporte para o laboratório de Microbiologia Ambiental – Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna/ SP, a amostra foi imediatamente processada. Parte do corpo da esponja foi armazenada em etanol

para identificação taxonômica por especialista em Porifera do Museu Nacional (Dr. Fernando Coreixas de Moraes).



Figura 5 - Esquema de coleta de esponja marinha na face leste do Arquipélago de São Pedro e São Paulo

4.2.2 Isolamento Seletivo para actinobactérias

⊛ Como obter as culturas associadas

As amostras foram inicialmente processadas por meio de trituração como estratégia para recuperar actinobactérias associadas ao interior do corpo da esponja marinha (ABDELMOHSEN et al., 2010). Para isto pedaços de 1 cm³ do corpo da esponja foram trituradas e homogeneizadas. Após a trituração uma suspensão contendo 1 g do tecido da esponja e 9 mL de solução de água marinha artificial estéril foi preparada para cada amostra e misturada em agitador de tubo por 30 minutos.

Um pré-tratamento de exposição ao ultra-som por 40 segundos (BREDHOLDT et al., 2007) foi realizado antes do plaqueamento por diluição seriada,

para aumentar a frequência de isolamento de actinobactérias raras ou espécies novas. Após o pré-tratamento foram realizadas diluições seriadas da ordem de 10^{-1} a 10^{-5} da suspensão inicial e então plaqueadas em meios de cultivo seletivo para o isolamento de actinobactérias como descrito na Tabela 1. Após incubação a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 21 dias as colônias de actinobactérias foram purificadas em meio ISP3 (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). As placas de purificação foram incubadas por 1 a 4 semanas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os isolados purificados foram identificados com códigos específicos e então armazenados em água destilada esterilizada também conhecida como método de Castellani. Esporos e fragmentos de micélio foram armazenados a -80°C , utilizando-se glicerol 20% como crioprotetor.

Tabela 1 - Composição dos diferentes meios de cultivo utilizados para o isolamento de gêneros específicos de actinobactérias da esponja marinha *Aplysina fulva*

Meio de cultivo*	Gênero alvo	Composição do meio de cultivo
M1	<i>Rhodococcus</i> e <i>Dietzia</i> (ROWBOTHAM; CROSS, 1977)	água artificial marinha 1 L; ágar 18 g; amido 10 g; extrato de levedura 4 g; peptona 2g; novobiocina 5 µg/ml; Nistatina 30 µg/ml
M4	<i>Verrucosipora</i> (XIE et al., 2011)	água artificial marinha 1 L; ágar 15 g; arabnose 1 g; salicina 1 g; L- fenilalanina 0,10 g; fosfato dissódicodibásico 12-hidratado (Na ₂ HPO ₄) 0,80 g; fosfato de potássio dibásico (KH ₂ PO ₄) 0,20; sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O) 0,20 g; cloreto de cálcio (CaCl ₂) 0,20 g; Cloreto de cálcio (CaCl ₂); cloreto férrico hexahidratado (FeCl ₃ .6H ₂ O) 5 mg; Molibdato de sódio (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O) 1 g; Dicronato de potássio (K ₂ Cr ₂ O ₇) 2,5 g; novobiocina 5 µg/ml; nistatina 30 µg/ml
M5	<i>Salinispora</i> (XIE et al., 2011)	água artificial marinha 1 L, ágar 18 g; novobiocina 5 µg/ml; cicloexamida 20 µg/ml; nistatina 30 µg/ml
HVA	<i>Dactylosporangium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Streptosporangium</i> <i>Thermomonospora</i> (HAYAKAWA; NONOMURA, 1987)	água artificial marinha 1 L; ágar 15 g; ácido húmico 1 g; fosfato dissódicododecahidratado de hidrogénio (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O) 0,50 g; cloreto de potássio (KCl) 1,70 g; sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O) 0,10 g; solução de vitaminas 1 g; carbonato de cálcio (CaCO ₃) 0,01 g; tiamina 0,10 g; riboflavina 0,10 g; ácido nicotínico 0,10 g; piridoxina HCL 0,10 g; inositol 0,10 g; ácido pantotênico 0,10 g; ácido <i>p</i> -aminobenzóico 0,10 g; biotina 0,05 g; nistatina 50 µg/ml
SM3	<i>Amycolatopsis</i> (TAN et al., 2006)	água artificial marinha 1 L; ágar 16 g; D-glicose 10 g; peptona 5 g; triptona 3 g; cloreto de sódio 5 g; nistatina µg/ml
410	Membros da subordem <i>Corynebacterianae</i> , tais como <i>Gordonia</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> e <i>Tsukamurella</i> (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010)	água artificial marinha 1 L; ágar 15 g; glicose 10 g; glicerol 10 g; extrato de levedura 5 g carbonato de cálcio CaCO ₃ 1 g; aveia 5 g; caseína ácida hidrolisada 15 g peptona 10 g; novobiocina 5 µg/ml; nistatina µg/ml

*Todos os meios de cultivos foram preparados com água marinha artificial. Cada meio seletivo foi preparado com e sem fenol separadamente

4.2.3 Identificação molecular de actinobactérias

Os isolados de actinobactéria foram reativados em placas contendo o meio de cultivo ISP3 (*International Streptomyces Project - Medium 1-7*), (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966), para checagem da pureza da colônia e posteriormente repicado

em tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo glicose-extrato de levedura (GORDON; MIHM, 1962), seguindo-se de incubação por 72 h a 28 °C e 150 rpm. A extração do DNA total das culturas foi realizada com o kit *Ultra Clean® Microbial DNA Isolation MO Bio*, de acordo com especificações do fabricante. A amplificação do gene que codifica para o rRNA 16S foi realizado como descrito por Turner et al.,(1999) utilizando o *primer* universal 8F(AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG). O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador 3500 *Genomic Analyzer (Applied Biosystems)*. As sequências foram comparadas com sequências de linhagens tipo utilizando o servidor EzTaxon-e (KIM et al., 2012). O alinhamento das sequências foi realizado com o programa *Clustal W* (THOMPSON et al., 1994). Árvores filogenéticas foram inferidas utilizando o método de neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987), através do programa *MEGA 5 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (TAMURA, 2013).

4.2.4 Extração dos metabólitos secundários

Os isolados de actinobactéria foram fermentados em 250 mL de três diferentes meios de cultivo modificados com água marinha artificial (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição dos diferentes meios de cultivo utilizados para a fermentação das actinobactérias isoladas da esponja marinha *Aplysina fulva*

Meio de cultivo	Composição do meio de cultivo
Czapek	3 g/L de nitrato de sódio (NaNO ₃); 1 g/L de fosfato dipotássico (KH ₂ PO ₄); 0.5 g/L de sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O); 0.5 g/L de cloreto de potássio (KCL); 0.01 g/L de sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O); 8 g/L de extrato de levedura; 15.0 g/L de dextrose; (pH 8.0)
GYE	10 g/L extrato de levedura, 10 g/L de glicose, (pH 8.0) + peptona.
BDA	200 mL/L de caldo de batata, 20 g/L de dextrose, (pH 8.0)

Posteriormente foram incubados a 28 °C, por 10 dias, sob agitação constante de 180 rpm. Após o crescimento as culturas foram submetidas ao sistema de filtração a vácuo (Sartorius), com membrana de celulose de 0,45 µm (Milipore), e centrifugação a 9000 rpm por 30 min a 4 °C para retirada das células. O filtrado foi submetido, por três vezes, ao processo de extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas (SDFA), com o solvente diclorometano na proporção de 1:1

(v/v) em pH 3.0, 7.0 e 10.0 onde houve a formação de duas camadas: uma aquosa, na parte inferior e outra orgânica, na parte superior. Foi adicionado à fase orgânica 5 % de sulfato de sódio anidro, filtrada em papel Whatman nº 4 e concentrada no evaporador rotativo (Quimis) a temperatura de 40 °C, à pressão reduzida (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001). O extrato bruto obtido foi pesado em balança analítica e armazenados em freezer a -20 °C. O extrato bruto seco do controle foi obtido através da extração do caldo de cultura sem inóculo.

4.2.5 Atividade antifúngica dos extratos de actinobactérias

A atividade antifúngica foi avaliada pela técnica de difusão em ágar, Kirby-Bauer (1960), utilizando-se discos de papel autoclavados e impregnados com 5 µL (5 mg/mL) da suspensão dos extratos brutos contra discos de 5 mm de meio BDA contendo colônias dos fitopatógenos e incubados a 28 °C. A avaliação para verificar inibição foi realizada após 24 h para *Pythium aphanidermatum*; 72h para *Phytophthora capsici*; e 120h para *Magnaporthe grisea*. A Nistatina foi utilizada como fármaco controle, e uma placa de cada fungo foi inoculada somente com o disco do patógeno para verificar o crescimento.

4.2.6 Perfil químico dos extratos brutos

O perfil químico dos extratos obtidos da fermentação em meios Czapek e GYE das actinobactérias que apresentaram bioatividade contra os fungos fitopatogênicos foi analisado através de seus íons precursores (UPLC/MS), em equipamento ACQUITY UPLC H-Class Xevo[®], TQ-S (Waters Corporation, Milford, MA, USA), com uma fonte de ionização *Z-spray*, modo *Full Scan*. A análise dos extratos consistiu em inserção direta com injeção de 3 µL de amostra. As análises foram realizadas em modo positivo e negativo, voltagem do capilar 3.2 kV, voltagem do cone 40 V, temperatura da fonte 150 °C e temperatura de dessolvatação do gás N₂ 300 °C. Os extratos foram analisadas em modo *Full Scan*, via inserção direta (ID/MS). As análises decorreram nas condições: voltagem da fonte ESI 4.0 kV, voltagem do capilar cone 47.96 V, fluxo de gás 0.09 Lpm e temperatura do gás cone 270 °C

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Identificação da esponja marinha

Amostras da esponja foram morfológica e anatomicamente caracterizadas por identificação taxonômica, realizada por comparação de descrição de espécies da literatura especializada (WIEDENMAYER, 1977; MORAES, 2011) e por espécimes de referência da Coleção de Porífera do Museu Nacional, Rio de Janeiro Brasil. Desta forma a esponja marinha foi identificada como pertencente à espécie *Aplysina fulva* (PALLAS, 1976), descrita na literatura por serem organismos produtores de lecitinas com propriedades hemoaglutinantes e derivados de dibromotirosinas com atividade citotóxica e antimicrobiana (PINHEIRO; HAJDU, 2001). Entretanto, alguns estudos mostram que compostos bioativos como peptídeos, e peptídeos não ribossomais encontrados em diversas espécies de esponjas são produzidos pela microbiota associada (PIEL 2004; KIM et al., 2006). Metabólitos com atividade citotóxica e antitumoral mostram o potencial das esponjas marinhas na prospecção de micro-organismos de interesse biotecnológico (THIEL 2003; PIEL et al., 2004; BLUNT 2005). Contudo devido à grande distribuição da *Aplysina fulva* ao longo de toda costa Brasileira (HARDOIM, 2009), esta espécie pode ser de grande importância em estudos de relação microbiota/esponja e para a busca de novas moléculas bioativas.

4.3.2 Isolamento Seletivo

A metodologia de processamento para recuperar actinobactérias associadas ao interior do corpo de esponjas marinhas proposta por Abdelmohsen et al., (2010) complementada ao pré-tratamento com ultra-som e plaqueamento em meios seletivos para gêneros raros foram bem sucedidos no isolamento de actinobactérias. De um total de 61 colônias isoladas nos diversos meios de cultivo seletivos para variados gêneros de *Actinobacteria*, 21 foram caracterizadas como pertencentes ao filo. Estes isolados foram selecionados de acordo com características morfológicas sustentadas com o sequenciamento parcial do gene que codifica para o rRNA 16S. As análises físico-químicas da água periférica no sitio de coleta da esponja marinha serviram de parâmetros para mimetização do habitat nos preparos dos meios de

cultivo e incubação. Condições de salinidade, pH e temperatura de incubação foram utilizados de acordo com os dados obtidos (Tabela3).

Tabela3 - Parâmetros físico-químicos da água no sítio de coleta situado na Face Leste do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (0°54'57,86"N; 29°20'41,34"O)

Parâmetros	Valores *
t°C	25.74 ± 0.0776
pH	8.09 ± 0.3271
Oxigênio dissolvido (mg/L)	9.52 ± 1.7795
Sólidos totais dissolvidos (g/L)	30.2 ± 0.1732
Salinidade (ppt)	30.2 ± 0.0577

*valores são expressos como média e desvio padrão de triplicatas

Em estudos anteriores relacionados à diversidade total de micro-organismos associados às esponjas marinhas com base em metodologias independentes de cultivo, Hardoim et al. (2009) verificou que o filo *Actinobacteria* foi o quinto mais abundante sendo representado por 8 % do total de sequências da microbiota de *Aplysina fulva*. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Dupont et al. (2014) que verificou que o filo *Actinobacteria* foi o quarto mais abundante com 4 % do total de sequências de micro-organismos associados a esponja *Asbestopluma hypogea*. Entretanto em estudos de diversidade de actinobactérias associadas às esponjas marinhas baseados em técnicas dependentes de cultivo com estratégia de meios seletivos para isolamento foi reportado por Jiang et al. (2007) o isolamento de 24 actinobactérias de um total de 54 colônias da esponja do gênero *Haliclona* sp. No estudo conduzido por Sun et al. (2009) foram recuperados 24 isolados de actinobactéria representando 13% do total de micro-organismos isolados.

Neste estudo 35 % do total de colônias isoladas pertencem ao filo actinobactéria, confirmando desta forma a relevância dos meios de cultivo seletivos para o isolamento direcionado e específico de organismos de interesse.

4.3.3 Identificação molecular de actinobactérias

O sequenciamento parcial do gene que codifica o rRNA 16S resultou em fragmentos de 400 pb que foram comparados com sequências de linhagens tipo utilizando o servidor EzTaxon-e (KIM et al., 2012). Análises filogenéticas indicaram

que as actinobactérias cultiváveis isoladas da esponja marinha *Aplysina fulva* foram agrupadas com membros dos gêneros: *Streptomyces*; *Brevibacterium*; *Tsukamurella*; *Agrococcus*; *Gordonia*; *Terrabacter*; *Citricoccuse* *Kocuria* (Figura 6).

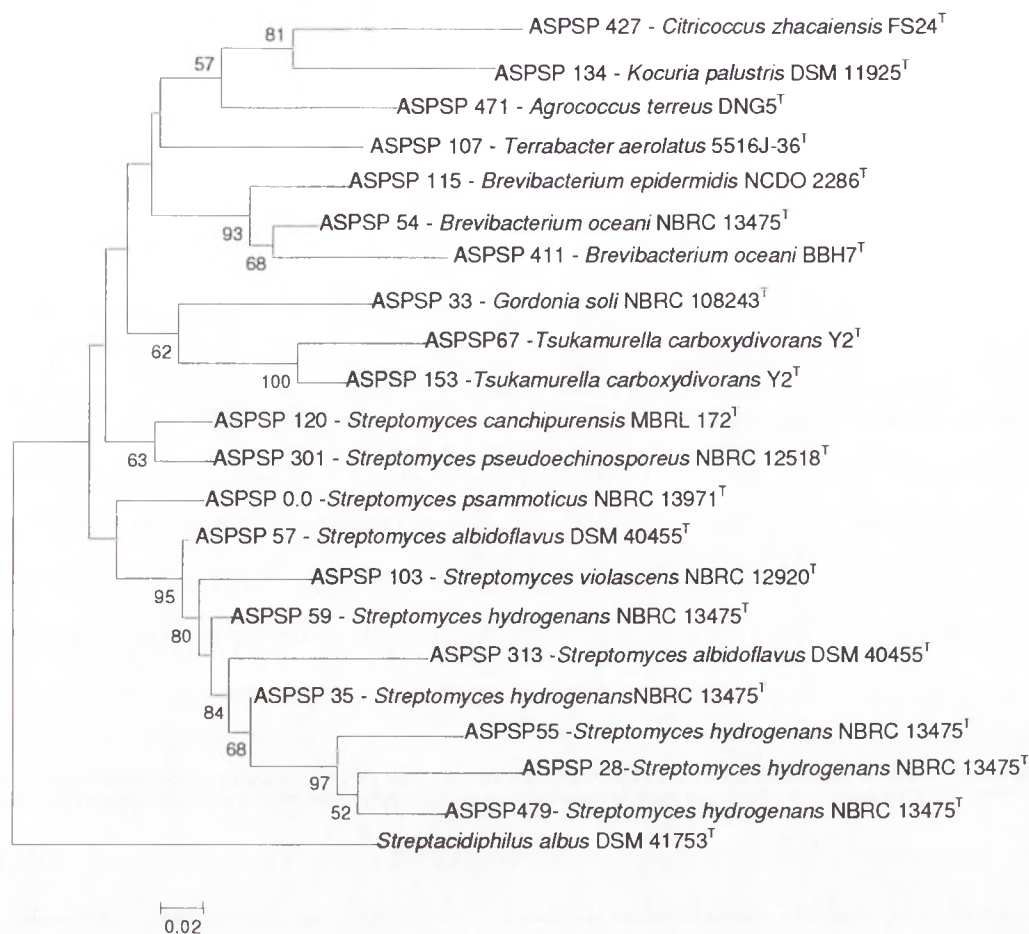


Figura 6 - Relações filogenéticas (400pb) do gene 16S rRNA entre as linhagens de actinobactérias isoladas da esponja marinha *Aplysina fulva*. As linhagens ASPSP estão apresentadas com as espécies tipo de maior similaridade (ASPSP – *type strain*^T). A análise foi realizada com base no algoritmo evolutivo de *Neighbour-Joining* com utilização do programa computacional Mega 5.2. Números nos nós representam as porcentagens de suporte (*bootstrap*) usando 1000 pseudorepetições (apenas valores de 50 % são representados). Barra de 0.02 substituições por posição nucleotídica

Como grupo externo para compor a raiz da árvore filogenética foi selecionada a sequência da linhagem *Streptacidiphilus albus* DSM 41753^T AF074415 (KIM et al.,2003), espécie tipo do gênero *Streptacidiphilus*, que partilha propriedades quimiotaxonômicas e morfológicas com *Streptomyces*.

A maioria das actinobactérias isoladas pertencem ao gênero *Streptomyces* (52.3 %). Neste grupo cinco micro-organismos (ASPSP-28; 35; 55; 59 e 479) possuem maior identidade (98 %) com a linhagem *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T. *S. hydrogenans* NBRC 13475^T é considerado um actinomiceto cosmopolita, sendo encontrado em vários habitats, porém foi primeiramente descrito por Lindner et al. (1958), com a espécie tipo isolada de solo. Os isolados ASPSP 57 e 313 tiveram maior identidade (100 e 96.66 %) com *S. albidoflavus* DSM 40455^T, cujo espécie tipo foi descrita por Waksman; Henrici,(1948). ASPSP 103 obteve baixa identidade (97 %) com *Streptomyces violascens* NBRC 12920^T, espécie freqüentemente encontrada em ambiente marinho e associados a esponjas como *Haliclona simulans*, (VIEGELMANN et al., 2014), *Aplysina aerophoba*, *Axinella polypoides*, *Tedania* sp. e *Tethya* sp. (PIMENTEL-ELARDO et al., 2014). A identidade de ASPSP 0.0 foi de 100 % com *Streptomyces psammoticus* NBRC 13971^T (SUJATHA et al., 2005), já isolado de sedimento marinho. Os isolados ASPSP 120 e 301 formaram um grupo filético similar suportado com valor de *bootstrap* de 63. Ambos os isolados possuem 100 % de identidade com *S. pseudoechinosporeus* NBRC 12518^T (GOODFELLOW et al.,1968) e *S. canchipurensis* MBRL 172^T(LI et al., 2015) respectivamente.

O segundo grupo dominante de actinobactérias cultivadas da esponja marinha *A. fulva* foi o gênero *Brevibacterium* (14.2 %). O isolado ASPSP 115 foi verificado com baixa identidade (96.86 %) com a linhagem *Brevibacterium epidermidis* NCDO 2286^T (COLLINS et al., 1983). Em adição os isolados ASPSP 54 e 411 foram 100 % homólogos a *Brevibacterium oceani* NBRC 13475^T, ao qual a espécie tipo foi isolada de sedimentos de regiões oceânicas abissais (HADRA et al., 2008).

O gênero *Tsukamurella* representou 9.5 % do total de actinobactérias. Os isolados ASPSP 153 e 67 tiveram uma baixa identidade (97 %) com a linhagem *Tsukamurella carboxydivorans* Y2^T (PARK et al., 2009). Representantes deste gênero já foram isolados de esponjas marinhas de águas profundas (OLSON et al., 2007).

Espécies dos gêneros *Citricoccus*, *Terrabacter*, *Agrococcus*, *Kocuria* e *Gordonia* foram menos expressivas, pois apenas uma linhagem de cada grupo foi isolada da esponja *A. fulva*. ASPSP 427 possui 98 % de identidade com *Citricoccus zhacaiensis* FS24^T cuja espécie tipo foi isolada de águas hiper-salinas (MENG et al.,

2010). A sequência do isolado ASPSP 107 obteve 99.27 % de homologia com *Terrabacter aerolatus* 5516J-36^T(WEON et al., 2007). Foi verificada baixa identidade (96.92 %) de ASPSP 471 com a linhagem *Agrococcus terreus* DNG5^T, cujo gênero já foi identificado em sedimentos marinhos no Ártico (ZHANG et al., 2014). O isolado ASPSP 134 foi similar (99.3 %) a *Kocuria palustris* DSM 11925^T, espécie que já foi encontrada em sedimento marinho (MARTÍN et al., 2013). ASPSP 33 obteve baixa identidade (96.67 %) com *Gordonia soli* NBRC 108243^T. O gênero *Gordonia* é amplamente distribuído em solo e principalmente em ambientes aquáticos e marinhos, onde grande diversidade de espécies já foram relatadas em sedimentos de leitos oceânicos (GOODFELLOW; MALDONADO, 2006) (Tabela 4).

Tabela 4 - Afiliação taxonômica das actinobactérias isoladas da esponja marinha *Aplysina fulva*

Código do isolado	Meio de cultura de isolamento	Espécie mais similar	Similaridade (%)	Código de acesso GenBank da espécie tipo mais similar
ASPSP 0.0	SM3	<i>Streptomyces psammoticus</i>	100	AB184554
ASPSP 28	SM3	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	98	AB184868
ASPSP 33	HVA	<i>Gordonia soli</i>	96.67	BANX01000052
ASPSP 35	SM3	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	97.89	AB184868
ASPSP 54	SM3	<i>Brevibacterium oceanii</i>	100	AM158906
ASPSP 55	SM3	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	98	AB184868
ASPSP 57	HVA	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	100	Z76676
ASPSP 59	HVA	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	100	AB184868
ASPSP 67	SM3	<i>Tsukamurella carboxydivorans</i>	97	EU521689
ASPSP 103	HVA	<i>Streptomyces violascens</i>	97	AY999737
ASPSP 107	HVA	<i>Terrabacter aerolatus</i>	99.27	EF212039
ASPSP 115	SM3	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	96.86	X76565
ASPSP 120	SM3	<i>Streptomyces canchipurensis</i>	100	JN560154
ASPSP 134	M1	<i>Kocuria palustris</i>	99.3	Y16263
ASPSP 153	SM3	<i>Tsukamurella carboxydivorans</i>	96.85	EU521689
ASPSP 301	SM3	<i>Streptomyces pseudoechinosporeus</i>	100	AB184100
ASPSP 313	HVA	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	96.66	Z76676
ASPSP 411	M1	<i>Brevibacterium oceanii</i>	99.1	AM158906
ASPSP 427	HVA	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	98	EU305672
ASPSP 471	SM3	<i>Agrococcus terreus</i>	96.92	FJ423764
ASPSP 479	M1	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	98	AB184868

Seis meios de cultivo foram utilizados para o isolamento seletivo de *Actinobacteria*. Cada meio de cultivo foi preparado com e sem fenol como pré-tratamento como estratégia de eliminar microorganismos de crescimento rápido e propiciar o desenvolvimento de gêneros raros. No entanto, a eficácia dos diferentes meios diferiu consideravelmente. Somente os meios SM3, HVA e M1 sem fenol propiciaram o crescimento de colônias identificadas como pertencentes aos oito gêneros de *Actinobacteria* (Figura7). Apesar do meio SM3 ter sido desenvolvido para o isolamento de *Amycolatopsis* (TAN et al., 2006), a maioria dos isolados de quatro diferentes gêneros (*Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Tsukamurella* e *Agrococcus*) foram recuperados neste cultivo. A maioria dos *Streptomyces* isolados foram recuperados do meio SM3.

O meio de cultivo HVA foi inicialmente formulado para o isolamento seletivo de *Dactylosporangium*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Streptosporangium* e *Thermomonospora* (HAYAKAWA; NONOMURA, 1987). Neste estudo foram recuperados quatro gêneros deste meio: *Streptomyces*, *Gordônia*, *Terrabacter* e *Citricoccus*.

Do meio M1 seletivo para *Rhodococcus* e *Dietzia* desenvolvido por Rowbotham e Cross (1977), foram isoladas linhagens dos gêneros *Streptomyces*, *Brevibacterium* e *Kocuria*.

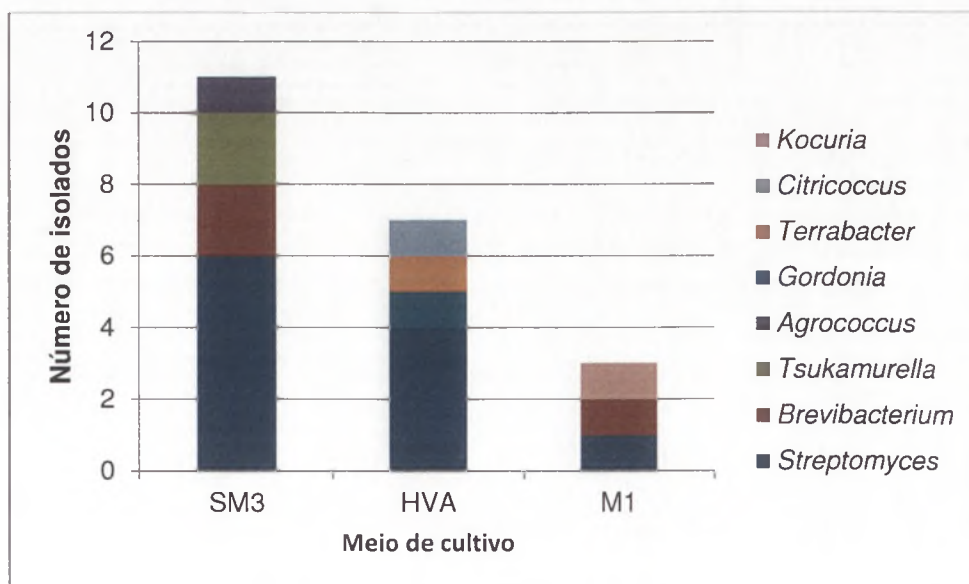


Figura 7 - Gráfico do número de gêneros de actinobactérias isoladas nos diferentes meios de cultivo

4.3.4 Atividade antifúngica de extratos bruto de actinobactérias

O extrato bruto de todas as 21 actinobactérias isoladas da esponja marinha *Aplysina fulva* foram avaliados para atividade fungicida contra *Pythium aphanidermatum*; *Phytophthora capsici* e *Magnaporthe grisea*.

O patógeno *P. aphanidermatum* é um oomiceto, que diferente dos fungos verdadeiros possui a parede celular construída de celulose ao invés de quitina. É um patógeno de solo de grande importância agrícola, uma vez que causam tombamento em plântulas de milho, algodão, cereais e hortaliças (AGRIOS, 1997).

Assim com *P. aphanidermatum*, o patógeno *P. capsici* é um oomiceto de grande importância por ser o agente causal da podridão em pimentas e danos em outras culturas como feijão, berinjela, tomate, abóbora, melão e pepino (AGRIOS, 1997).

M. grisea é um fungo ascomiceto. É um patógeno vegetal extremamente eficaz, com reprodução sexuada e assexuadamente. Produzem estruturas infecciosas conhecidas como apressórios que infectam tecidos aéreos e hifas que podem infectar os tecidos da raiz. *M. grisea* é o agente causal da brusone do arroz, trigo, centeio, cevada e moxoeira (WILSON, 2009).

As actinobactérias isoladas da esponja *A. fulva* foram fermentadas nos meios de cultivo GYE, Czapek e BDA e a extração dos metabólitos realizadas em pH 3; 7 e 10 para o teste de inibição dos fungos patogênicos (Tabela 5).

Tabela 5 - Atividade antifúngica dos extratos bruto das actinobactérias isoladas da esponja marinha *Alysina fulva*. Os isolados foram fermentados em diferentes meios de cultivo. A extração foi realizada com diclorometano em diferentes faixas de pH. (continua)

Isolado	Fungo patogênico	Meio de cultivo/ Extração de metabólitos em pH 3 – 7 – 10		
		GYE pH > 3, 10	Czapek 3, 3, 10	BDA 3, 3, 10
ASPSP 0.0	<i>Pythium aphanidermatum</i>	+ --	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 28	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 33	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 35	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 54	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 55	<i>Pythium aphanidermatum</i>	+ --	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	+ --	---	---
ASPSP 57	<i>Pythium aphanidermatum</i>	+ --	+ --	+ --
	<i>Phytophthora capsici</i>	+ --	+ --	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	+ --	+ --	---
ASPSP 59	<i>Pythium aphanidermatum</i>	+ --	+ --	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	+ --	+ --	---
ASPSP 67	<i>Pythium aphanidermatum</i>	+ --	+ --	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	+ --	+ --	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 103	<i>Pythium aphanidermatum</i>	++ -	++ -	+ --
	<i>Phytophthora capsici</i>	+ --	+ --	+ --
	<i>Magnaporthe grisea</i>	++ -	++ -	+ --

S. hydrophobus
97.89%

Trichamurella
carbonydivorans
97%

Tabela 5 - Atividade antifúngica dos extratos bruto das actinobactérias isoladas da esponja marinha *Alysina fulva*. Os isolados foram fermentados em diferentes meios de cultivo. A extração foi realizada com diclorometano em diferentes faixas de pH (continuação)

Isolado	Fungo patogênico	Meio de cultivo/ Extração de metabólitos em pH 3 – 7 – 10		
		GYE	Czapek	BDA
ASPSP 107	<i>Pythium aphanidermatum</i>	+-	+-	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	+-	+-	---
ASPSP 115	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 120	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 134	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 153	<i>Pythium aphanidermatum</i>	+-	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	+-	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 301	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 313	<i>Pythium aphanidermatum</i>	+-	+-	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	+-	+-	---
ASPSP 411	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 427	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---

Tabela 5 - Atividade antifúngica dos extratos bruto das actinobactérias isoladas da esponja marinha *Alysina fulva*. Os isolados foram fermentados em diferentes meios de cultivo. A extração foi realizada com diclorometano em diferentes faixas de pH (conclusão)

Isolado	Fungo patogênico	Meio de cultivo/ Extração de metabólitos em pH 3 – 7 – 10		
		GYE	Czapek	BDA
ASPSP 471	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---
ASPSP 479	<i>Pythium aphanidermatum</i>	---	---	---
	<i>Phytophthora capsici</i>	---	---	---
	<i>Magnaporthe grisea</i>	---	---	---

Verificou-se que 43 % dos isolados produzem metabólitos bioativos contra ao menos um fungo testado. Dentre os extratos dos isolados com bioatividade positiva, todos os metabólitos extraídos em pH ácido da fermentação do meio GYE inibiram *Pythium aphanidermatum*. 29 % dos isolados com bioatividade inibiram *Magnaporthe grisea*, e 19 % inibiram *Phytophthora capsici*. Somente o extrato do isolado ASPSP 103 produziu metabólitos bioativos em meio BDA, e na faixa de pH neutro. Os extratos obtidos em pH básico não tiveram bioatividade.

De acordo com os resultados observados, os extratos brutos fermentados no mesmo meio, mas em diferentes pHs apresentaram atividade biológica diferentes. Este padrão foi também observado por Sana e Fischer (2007), que verificou em análises espectrométricas que a mudança do pH (ácido e básico) do meio a ser extraído causa um aumento significativo na disponibilidade das diferentes moléculas alvos, onde foi recuperado 45 % a mais de moléculas únicas no pH ácido.

Além da grande diferença de bioatividade observada nos extratos obtidos com distintos pHs, os meios de cultivo também influenciaram na síntese de metabólitos bioativos pelos isolados. Os extratos dos *Streptomyces* ASPSP 103 e 57 tiveram o melhor resultado, pois foram os únicos a inibir os três patógenos testados.

4.3.5 Perfil químico dos extratos brutos

De acordo com os espectros de massas obtidos em modo positivo e negativo de análise foi possível observar diferentes padrões de perfis químicos entre os meios de cultivo que apresentaram melhor resultado para extração de metabólitos bioativos (GYE e Czapek) (Figura 8).

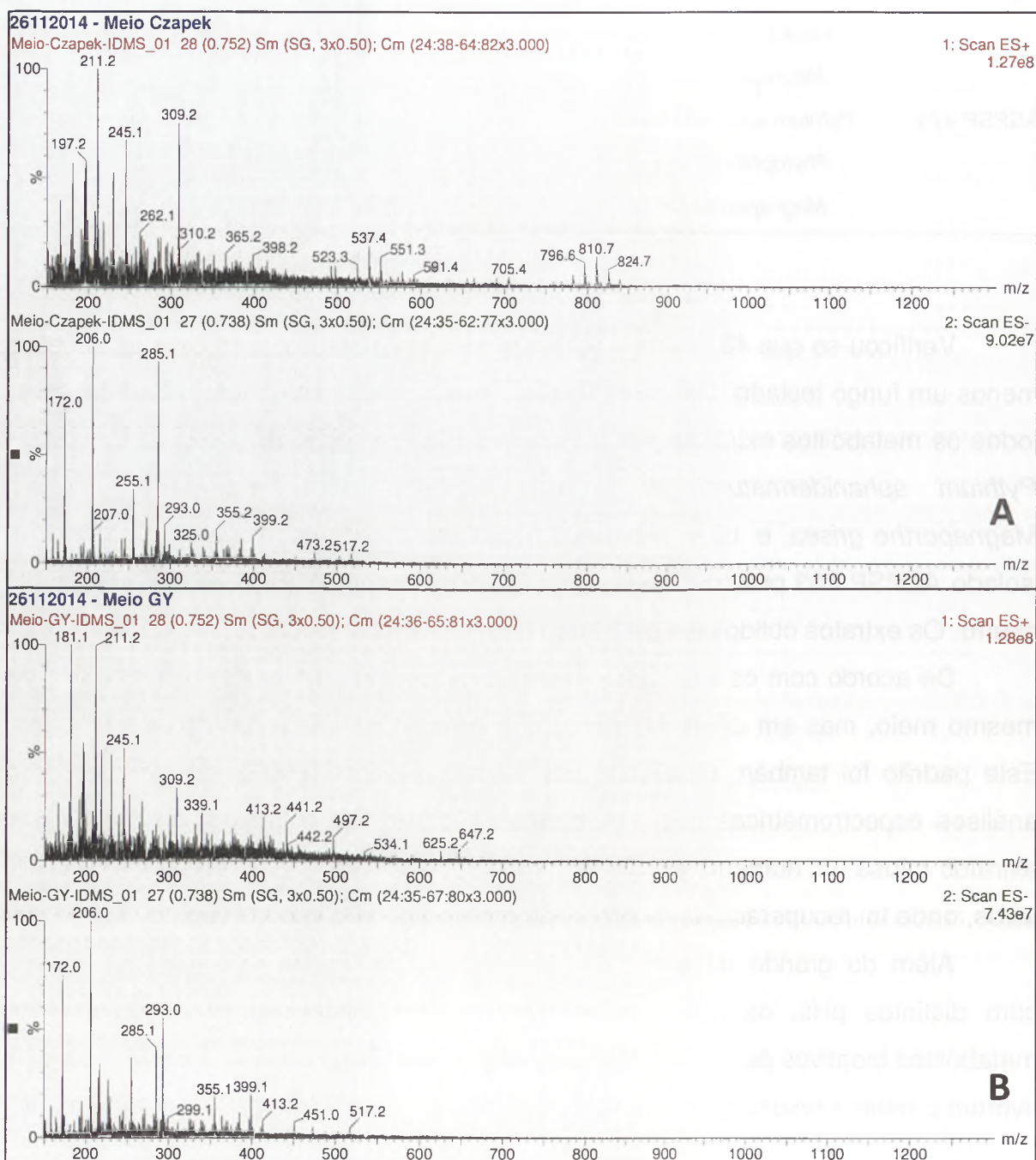


Figura 8 - Espectros de massas (ESI-MS) dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE

Os espectros de massas dos meios de cultivo Czapek e GYE (Figura 8) serviram como parâmetro comparativo para diferenciação do perfil metabólico entre os extratos brutos com bioatividade. De forma geral, a ionização em modo positivo apresentou melhor eficiência com uma maior diversidade de sinais.

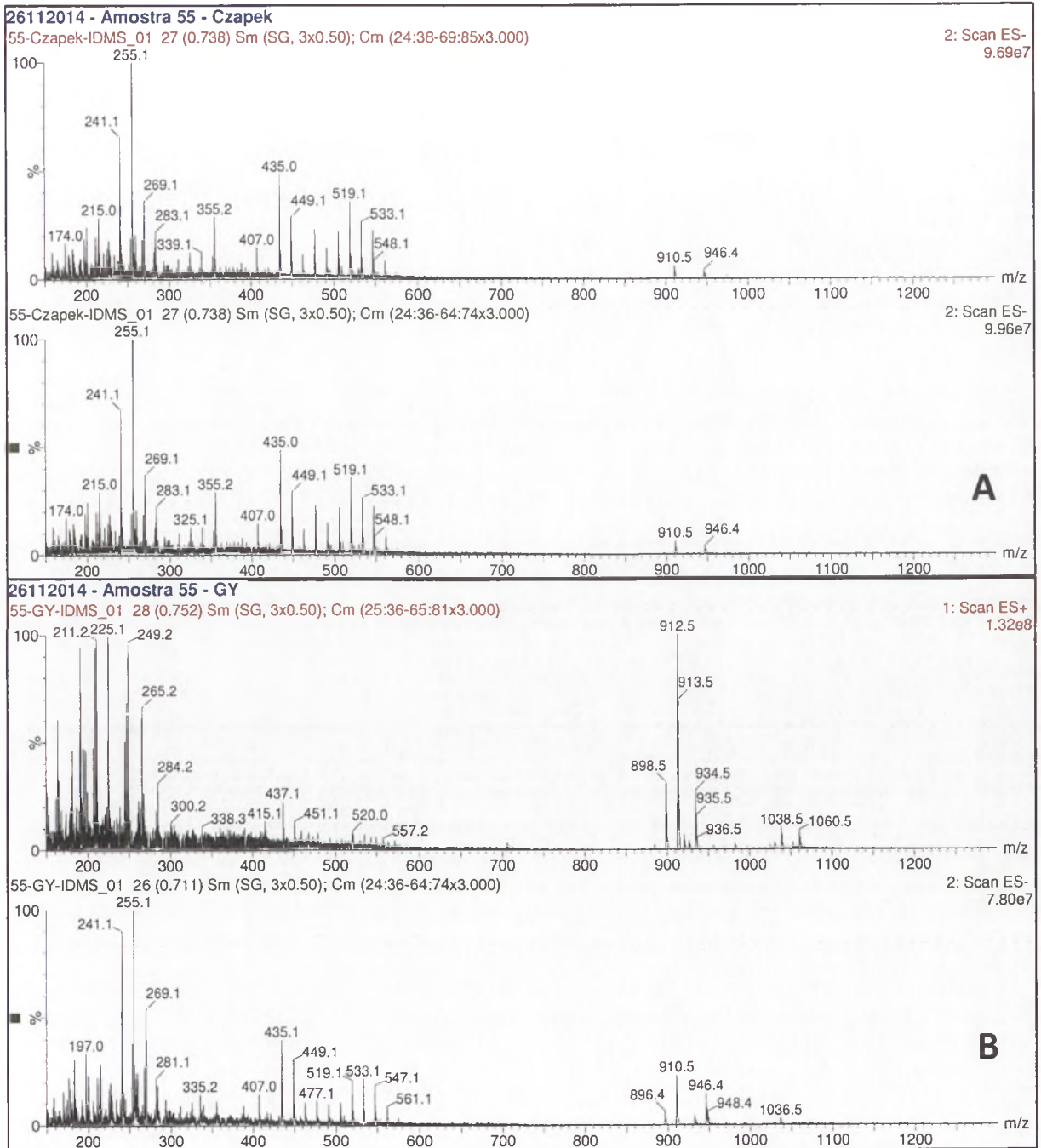


Figura 9 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 55 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE

Os espectros de massas dos extratos brutos do *Streptomyces* ASPSP 55 apresentaram perfis metabólicos semelhantes na faixa de massas de m/z 910-912. Porém o extrato bruto da fermentação em GYE (Figura9 B) possui intensidade significativamente maior do composto de m/z 912. Esta diferença metabólica pode explicar a bioatividade observada somente no meio GYE em extração ácida contra os patógenos *Pythium aphanidermatum* e *Magnaporthe grisea*. A espécie *Streptomyces hydrogenans* filogeneticamente mais relacionada ao isolado ASPSP 55 é descrita por produzir metabólitos bioativos contras os fungos *Colletotrichum acutatum*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria brassicicola*, *Exserohilum* sp., *Alternaria mali*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Alternaria alternata*, *Cercospora* sp., *Fusarium oxysporum* sp. (KAUR; MANHAS, 2014).



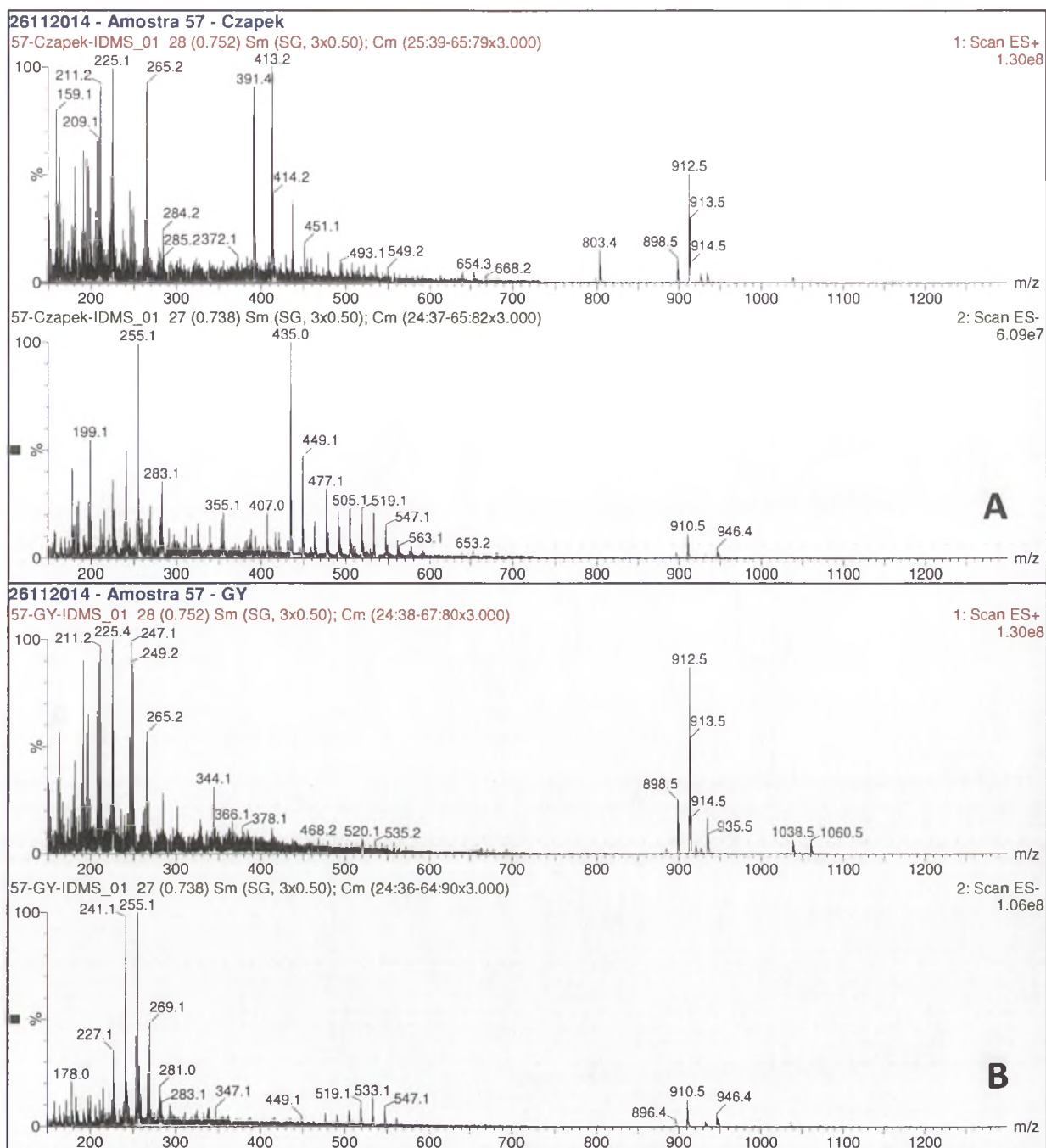


Figura 10- Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 57 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE

Os extratos dos meios de cultivo Czapek e GYE do *Streptomyces* ASPSP 57 foram expressivos como fungicida inibindo *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* e *Magnaporthe grisea*. Os espectros de massas dos extratos bruto provenientes dos dois meios de cultivo apresentaram perfis metabólicos muito semelhantes na faixa de massas de m/z 898-912. Embora a intensidade de sinal do espectro de m/z 912 tenha maior intensidade em GYE, também foi relativamente alta

no meio Czapek quando analisado o modo positivo (Figura10 – A, B). A afiliação taxônomica de ASPSP 57 foi de 100 % de similaridade com *Streptomyces albidoflavus* descrito por produzir o composto bioativo Antimycin A18 com propriedade fungicida moderada contra *Magnaporthe grisea* (YAN et al., 2010).

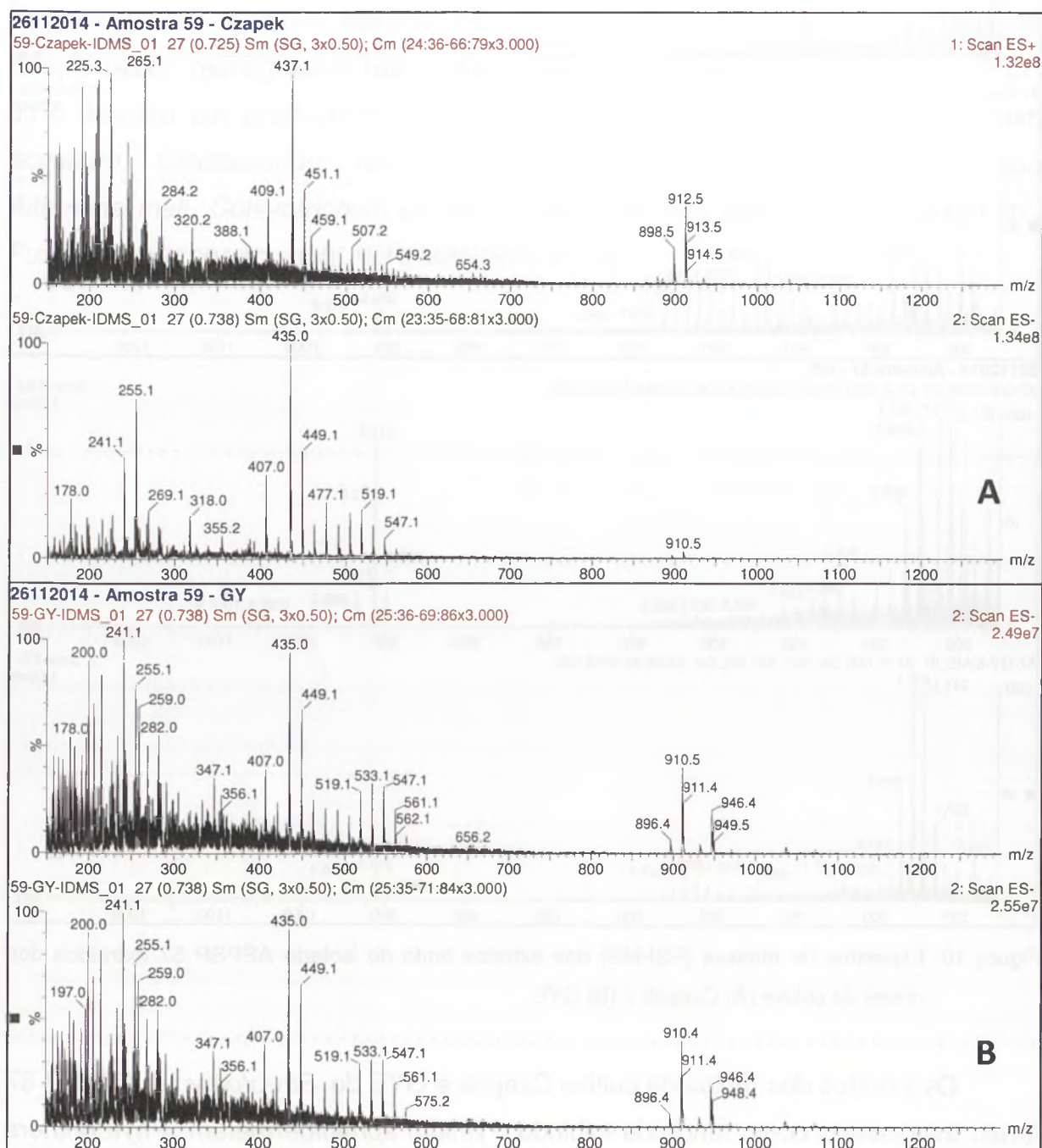


Figura 11- Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 59 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE

Filogeneticamente semelhante à ASPSP 55, o isolado ASPSP 59 possui similaridade com *Streptomyces hydrogenans* e apresentou a biatividade contra *Pythium aphanidermatum* *Magnaporthe grisea* com os extratos dos meios Czapek e GYE. Porém o perfil metabólico de ASPSP 59 apresentou diferença na intensidade do sinal do espectro de m/z 912 no meio Czapek bem como bioatividade no extrato bruto deste meio, diferentemente de ASPSP 55 (Figura 9 A; Figura 11 A B).

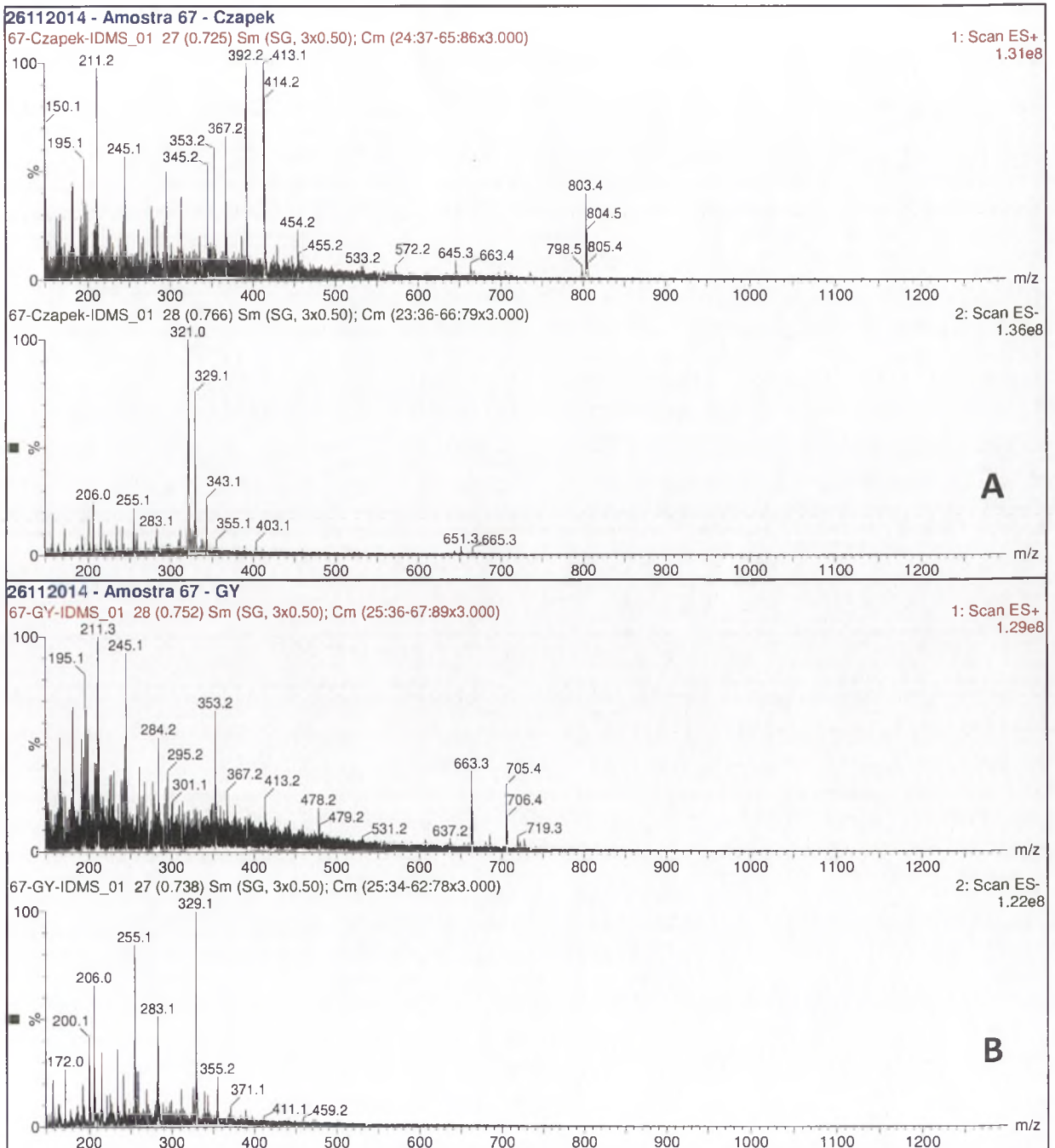


Figura 12 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 67 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE

Os espectros de massas dos extratos brutos do *Streptomyces* ASPSP 67 apresentaram perfis metabólicos distintos das demais actinobactérias (Figura 12 A B). Os extratos obtidos em Czapek e GYE inibiram os fungos *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora capsici* na faixa de massas de m/z 910-912. Os espectros do modo positivo da análise do meio Czapek possuem sinais constituintes na faixa de massas de m/z 798-805. No modo positivo do meio GYE os constituintes majoritários são sinais na faixa de massas de m/z 663-705. Foi reportada pela primeira vez a bioatividade fungicida da espécie *Tsukamurella carboxydivorans*, linhagem ao qual esta filogeneticamente correlacionado o isolado ASPSP 67. Porém devido ao baixo índice de similaridade (97 %) são necessários estudos mais aprofundados de taxonomia para classificação mais consistente do isolado.



Figura 12: Espectros de massa (12A-D)

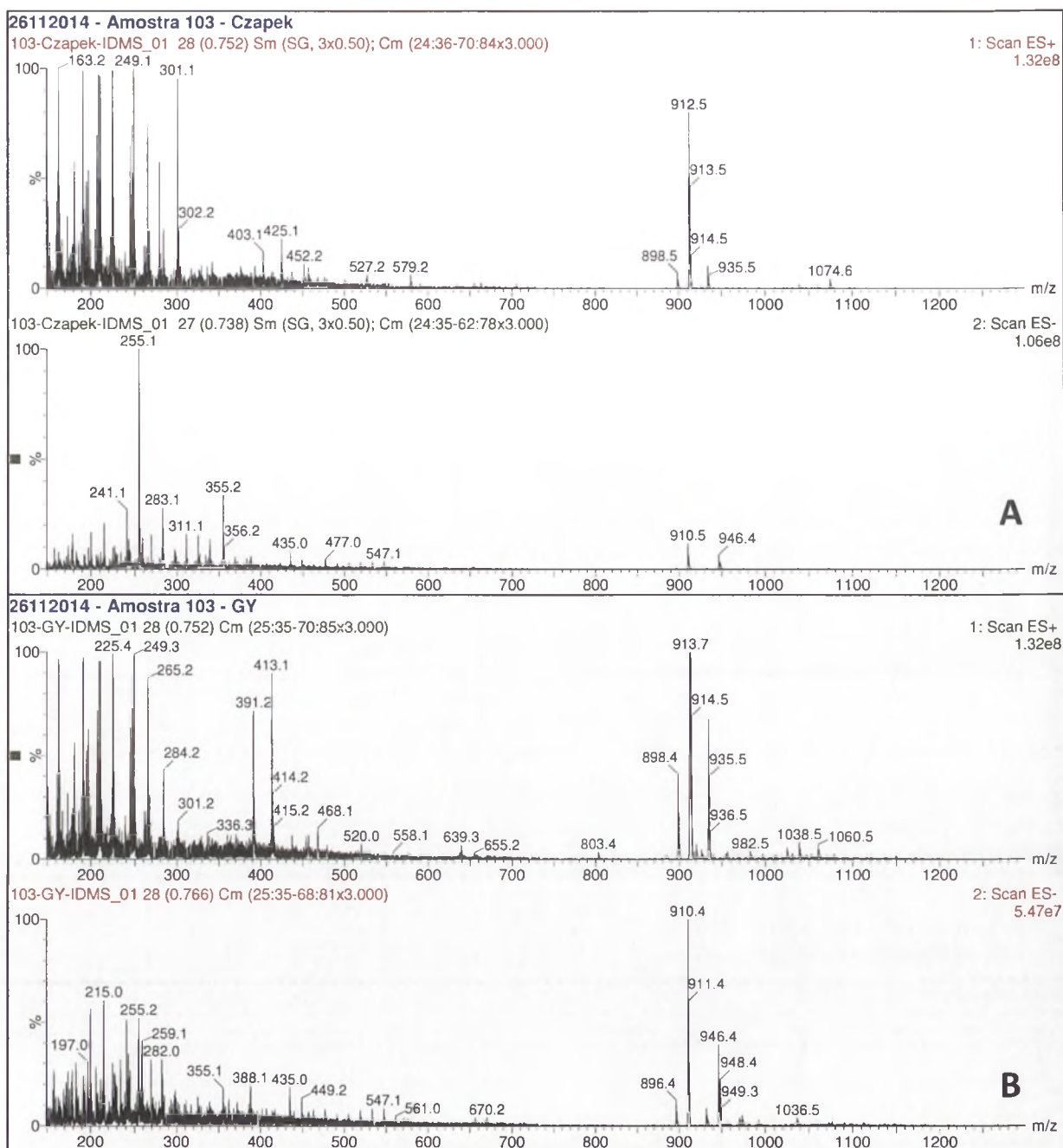


Figura 13 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 103 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE

Entre todos os isolados os extratos do *Streptomyces* ASPSP 103 foram mais eficientes como fungicida, pois inibiram todos os patógenos em diferentes condições de cultivo. Os espectros de massas dos extratos Czapek e GYE do *Streptomyces* ASPSP 103 apresentaram perfis metabólicos semelhantes na faixa de massas de m/z 898-935 (Figura 13). A alta intensidade de sinais destes constituintes majoritários verificados nos modo positivo dos dois meios de cultivo pode ser correlacionada à fração bioativa dos compostos sintetizados pelo micro-organismo.

A linhagem filogeneticamente mais próxima de ASPSP 103, *Streptomyces violascens*, é descrita como grande produtora de compostos bioativos com propriedades de inibição enzimática (TOMIOKA et al., 1976), atividade fungicida contra *Sclerotinia minor* (EL-TARABILY et al., 2000), *Colletotrichum gloeosporioides* e *Aspergillus niger* (CHOUDHARY et al., 2015). No entanto a baixa similaridade do gene rRNA 16S de apenas 97 % indica que estudos mais aprofundados em taxonomia devam ser conduzidos para classificação de ASPSP 103.

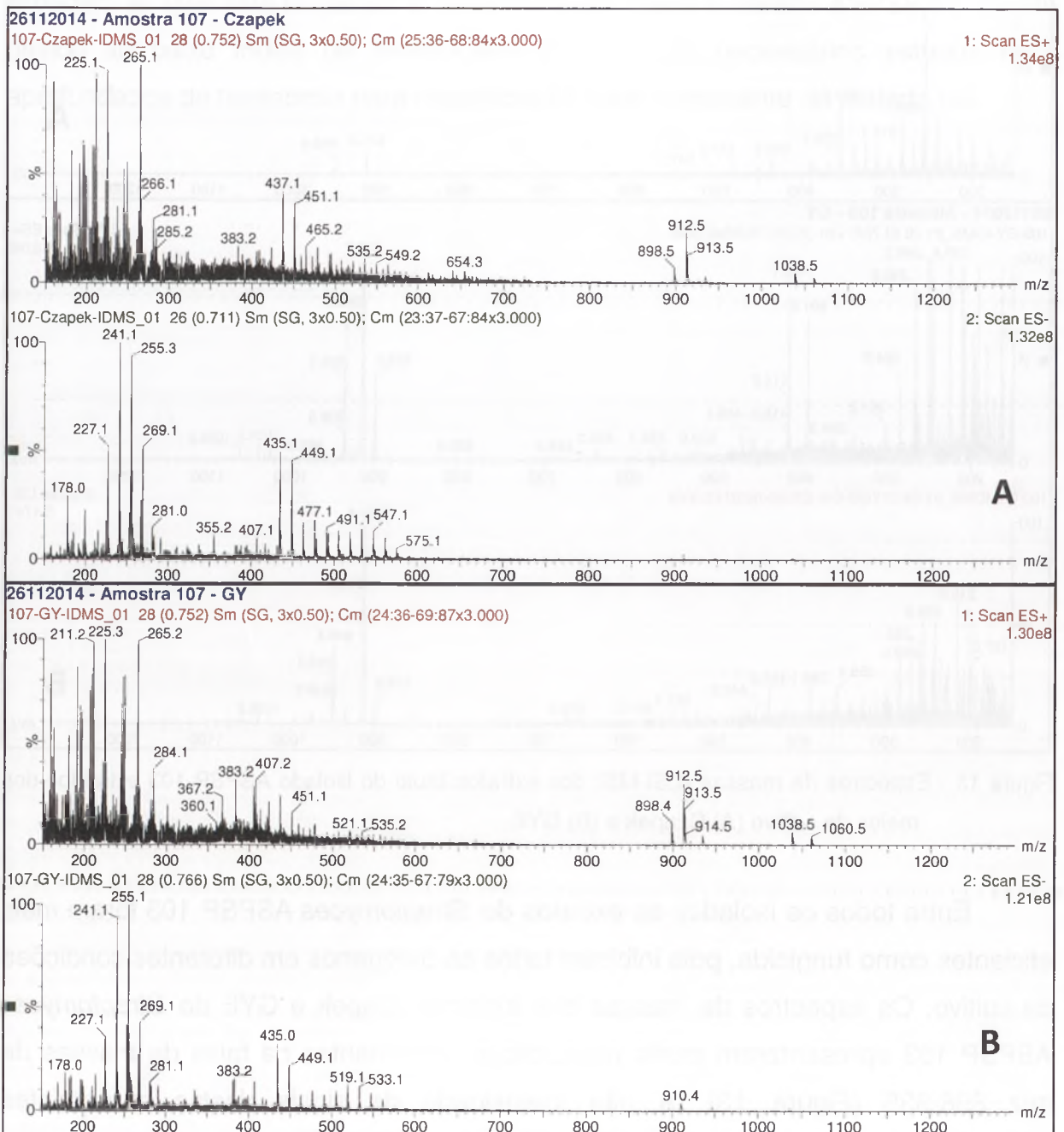


Figura 14- Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 107 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE

O isolado ASPSP 107, identificado como *Terrabacter aerolatus* apresentou perfil metabólico similar entre os meios de cultivo analisados (Figura 14). Os espectros de massas dos extratos Czapek e GYE de ASPSP 107 apresentaram como constituintes majoritários os sinais na faixa de massas de m/z 898-913, porém em menor intensidade se relacionado aos extratos dos *Streptomyces*, e um sinal de fraca intensidade de m/z 1038 similar a ASPSP 55, 57 e 103. Os extratos Czapek e GYE de ASPSP 107 inibiram *Pythium aphanidermatum* e *Magnaporthe*. Neste estudo foi pela primeira vez reportada a bioatividade fungicida relacionada à *Terrabacter aerolatus*.

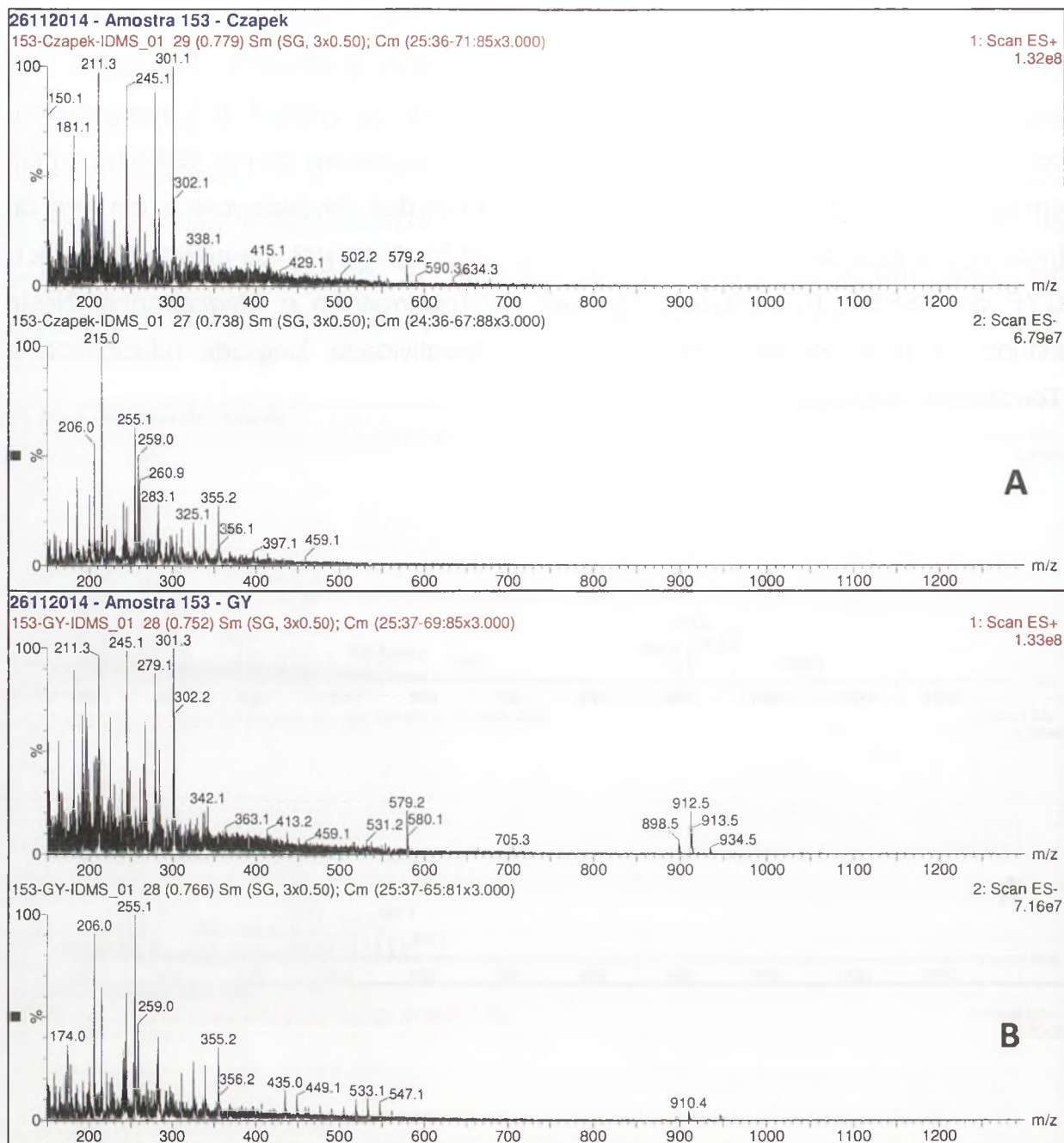


Figura 15 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 153 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE

Diferente da bioatividade e perfil químico dos extratos do isolado ASPSP 67 que inibiram *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora capsici* nos dois extratos analisados, ASPSP 153 também identificado como *Tsukamurella carboxydivorans* inibiu os mesmo patógenos, porém somente no extrato obtido do meio GYE. Os espectros de massas dos extratos Czapek e GYE de ASPSP 153 apresentaram sinais na faixa de massas de m/z 898-912 somente no modo positivo do extrato obtido do meio GYE (Figura 15). Devido à diferença do perfil químico e a baixa

similaridade de apenas 96.85 % com *Tsukamurella carboxydivorans* é necessário uma reavaliação taxonômica para o isolado ASPSP 153.

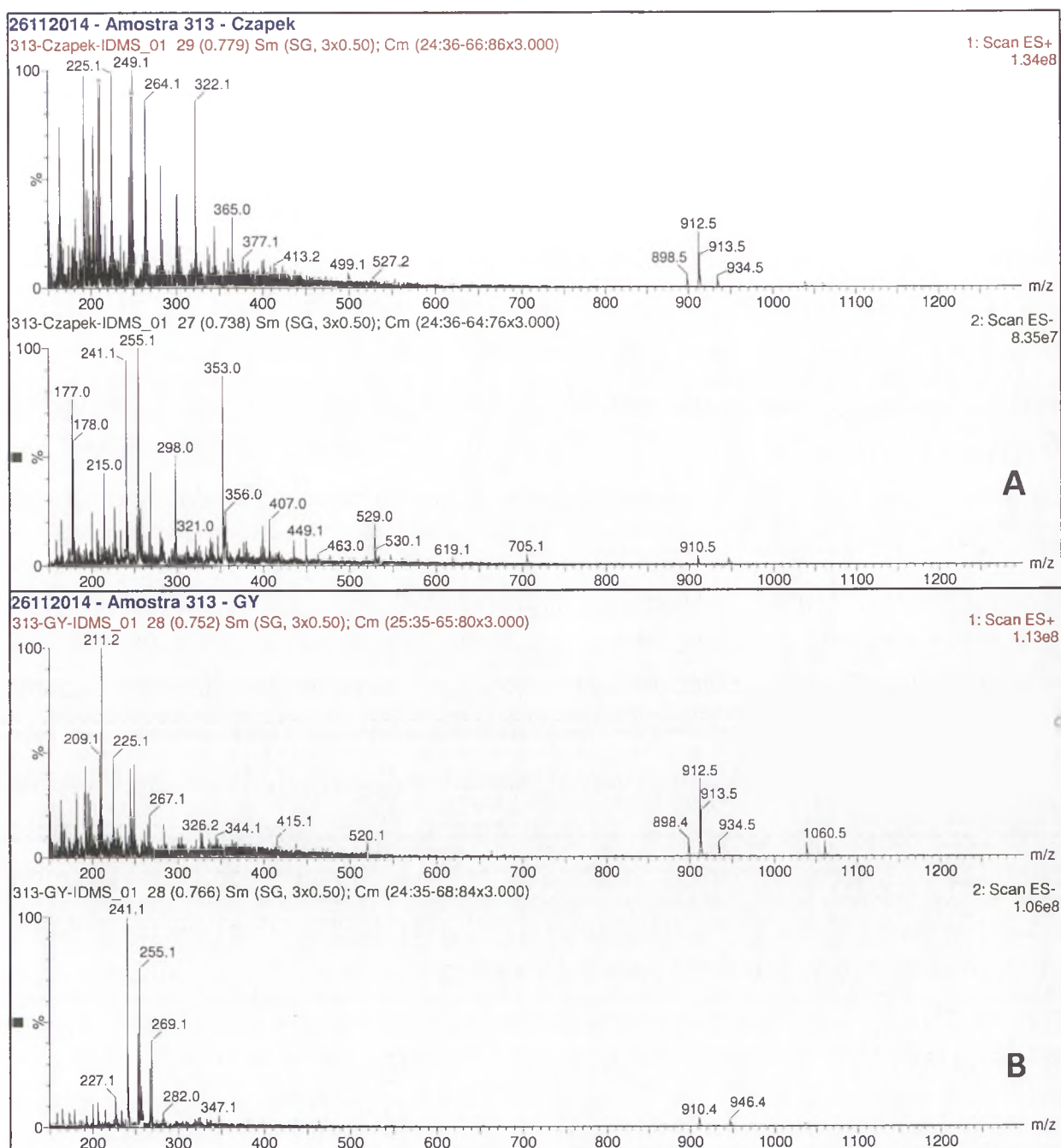


Figura 16 - Espectros de massas (ESI-MS) dos extratos bruto do isolado ASPSP 313 extraídos dos meios de cultivo (A) Czapek e (B) GYE

O isolado ASPSP 313, assim como com ASPSP 57 foi identificado como *Streptomyces albidoflavus*. No entanto a bioatividade dos extratos de ASPSP 313 foi menos eficiente inibindo somente os fungos *Pythium aphanidermatum* e *Magnaporthe grisea*. Os espectros de massas dos extratos bruto dos meios Czapek

e GYE de ambos os isolados apresentaram semelhança nos perfis metabólicos verificados na faixa de massas de m/z 898-934, porém com intensidade de sinais muito menores aos observados nos extratos de ASPSP 57. Estas análises indicam a necessidade de novos estudos taxonômicos para ASPSP 313, devido ao padrão de bioatividade e a análise filogenética que indicou identidade de apenas 96.66 % com *S. albidoflavus*.

Deste modo, os resultados de bioatividade fungicida e análise por ESI-MS obtidos para os diferentes extratos brutos das actinobactérias isoladas da esponja marinha *A. fulva*, indicam que os compostos estão sendo produzidos em função dos meios de cultivo testados. A diversidade química encontrada nos extratos brutos estudados se deve a capacidade biossintética do micro-organismo em sofrer variações das condições de fermentação, bem como dos meios de cultivo empregados (TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Neste contexto, a manipulação dos parâmetros do processo fermentativo pode alterar a expressão dos metabólitos secundários produzidos.

Verificou-se que micro-organismos de diferentes gêneros possuem padrões com perfis metabólicos semelhantes. Isto indica que possivelmente os mesmos compostos bioativos são produzidos por diferentes espécies associadas à esponja marinha. De forma geral moléculas com bioatividade são produzidas em concentrações muito baixas por um só micro-organismo. Portanto este padrão observado pode ser uma eficiente estratégia para aumentar a concentração sistêmica de moléculas bioativas no tecido da esponja. Provavelmente esta sincronia na produção de metabólitos seja regulada por algum mecanismo de quimiotaxia, porém esta nova hipótese ainda deve ser investigada.

Referências

ABDELMOHSEN, U.R.; PIMENTE, S.M.; HANORA, A.; RADWAN, M.; ABOU-EL-ELA, S.H.; AHMED, S.; HENTSCHEL, U. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 3, p. 399-412, 2010.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1997. 270 p.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W.P.; MUNRO, M.H., NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, London, v. 24, n. 1, p. 31-86, 2007.

BOWEN, V.T. St. Paul's on the subway. **Oceanus**, Woods Hole, v. 12, n. 4, p. 2-4, 1966.

BREDHOLDT, H.; GALATENKO, O.A.; ENGELHARDT, K.; FJAERVIK, E.; TEREKHOVA, L.P.; ZOTCHEV S.B. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. **Environmental Microbiology**, Dordrecht, v. 9, n. 11, p. 2756-2764, 2007.

BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. Phylum Porifera: the sponges. In: SINAUER, A.D. **Invertebrates**. Cambridge: Sinauer, 2002. p. 179-208.

BULL, A.T. **Microbial diversity and bioprospecting**. Washington: ASM Press, 2004. 220 p.

CHOUDHARY, B.; NAGPURE, A.; GUPTA, R.K. Biological control of toxigenic citrus and papaya rotting fungi by *Streptomyces violascens* MT7 and its extracellular metabolites. **Journal of Basic Microbiology**, London, v. 55, n. 1, p. 1-14, 2015.

COLLINS, M.D. **Isoprenoid quinone analyses in bacterial classification and identification**. London: Society for Applied Bacteriology, 1985. 287 p. (Technical Series, 20).

DUPONT, S.; CARRE-MLOUKA, A.; DOMART-COULON, I.; VACELET, J.; BOURGUET-KONDRACKI, M.L. Exploring cultivable bacteria from the prokaryotic community associated with the carnivorous sponge *Asbestopium hypogea*. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 160-174, 2014.

EL-TARABILY, K.A.; SOLIMAN, M.H.; NASSAR, A.H.; AL-HASSANI, H.A.; SIVASITHAMPARAM, K.; MCKENNA, F.; HARDY, G.S. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, San Diego, v. 49, n. 5, p. 573-583, 2000.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H.P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematic. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 119-142, 2010.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; ALDERSON, G. Transfer of *Elytrosporangium brasiliense* Falcão de Moraes et al., *Elytrosporangium carpinense* Falcão de Moraes et al., *Elytrosporangium spirale* Falcão de Moraes, *Microellobosporia cinerea* Cross et al., *Microellobosporia flavea* Cross et al., *Microellobosporia grisea* (Konev et al.) Pridham and *Microellobosporia violacea* (Tsyganov et al.) Pridham to the Genus *Streptomyces*, with emended descriptions of the species. **Systematic and Applied Microbiology**, Reading, v. 8, n. 1, p. 48-54, 1986.

GORDON, R.E.; MIHM, J.M. The type species of the genus *Nocardia*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 27, n. 1, p. 1-10, 1962.

HADRA, B.; RAGHUKUMAR, C.; PINDI, P.K.; SHIVAJI, S. *Brevibacterium oceani* sp. nov., isolated from deep-sea sediment of the Chagos Trench, Indian Ocean. **Systematic and Applied Microbiology**, Reading, v. 58, n. 1, p. 57-60, 2008.

HARDOIM, C.C.P.; COSTA, R.; ARAUJO, F.V.; HAJDU, E.; PEIXOTO, R.; LINS, U.; VAN ELSAS, J.D. Diversity of bacteria in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 10, p. 3331-3343, 2009.

HAYAKAWA, M.; NONOMURA, H. Efficacy of artificial humic acid is a selective nutrient in HV agar. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 65, n. 6, p. 609-616, 1987.

HAYAKAWA, M.; IINO, H.; TAKEUCHI, S.; YAMAZAKI, T. Application of a method incorporating treatment with chloramine-T for the selective isolation of Streptosporangiaceae from soil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 84, n. 6, p. 599-602, 1997.

HAYAKAWA, M.; OTOGURO, M.; TAKEUCHI, T.; YAMAZAKI, T.; IIMURA, Y. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 78, n. 2, p. 171-185, 2000.

HAZIN, F. **O Arquipélago de São Pedro e São Paulo: 10 anos de Estação Científica**. Rio de Janeiro: Marinha do Brasil, Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar, 2009. 106 p.

HOOPER, N.J.A., van SOEST R.W.M. **System Porifera: a guide to the classification of sponges**. New York: Springer US, 2002. 7 p.

JIANG, Y.; CAO, Y.; ZHAO, L.; WANG Q.; JIN, R.; HE, W.; XUE, Q. Ultrasonic treatment of soil samples for actinomycete isolation. **Acta Microbiologica Sinica**, New York, v. 50, n. 8, p. 1094-1097, 2010.

KAUR, T.; MANHAS, R.K. Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16. **Journal of Basic Microbiology**, Amsterdam, v. 54, n. 11, p. 1175-1185, 2014.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR, A.P. Purificação de produtos biotecnológicos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMILDELL, W. (Ed). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 2, p. 254.

KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S.-C.; JEON, Y. S.; LEE, J.H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, n. 3, p. 716-721, 2012.

KIM, S.B.; LONSDALE, J.; SEONG, C.N.; GOODFELLOW, M. *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae (Waksman and Henrici (1943) AL) emend. Rainey et al. 1997. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 83, n. 2, p. 107-116, 2003.

LI, C.W.; CHEN, J.Y.; HUA, T.E. Precambrian sponges with cellular structures. **Science**, Washington, v. 279, n. 5352, p. 879-882, 1998.

LI, R.Y.; WU, X.M.; YIN, X.H.; LONG, Y.H.; LI, M. Naturally produced citral can significantly inhibit normal physiology and induce cytotoxicity on *Magnaporthe grisea*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.118, n. 1, p. 19-25, 2015.

LINDNER, F.; JUNK, R.; NESEMANN, G.; SCHMIDT-THOMÉ, J. Gewinnung von 20 β -Hydroxysteroiden aus 17 α -21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden durch mikrobiologische Hydrierung mit *Streptomyces hydrogerans*. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, Berlin, v. 313, n. 1, p. 117-123, 1958.

MELSON, W.G.; HORT, S.R.; THOMPSON, G. St. Paul's Rocks, Equatorial Atlantic: petrogenesis, radiometric ages, and implications on sea-floor spreading. **Memoirs of the Geological Society of America**, New York, v. 132, p. 241-272, 1972.

MENG, F.X.; YANG, X.C.; YU, P.S.; PAN, J.M.; WANG, C.S.; XU, X.W.; WU, M. *Citricoccus zhacaiensis* sp. nov., isolated from a bioreactor for saline wastewater treatment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 3, p. 495-499, 2010.

MORAES, F.C. **Esponjas das ilhas oceânicas brasileiras**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011. 252 p. (Série Livros, 17).

OLSON, J.B.; DEDRA, K.; HARMODY, A.; SIM, K.; MCCARTHY, P.J. *Tsukamurella spongiae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a deep-water marine sponge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.57, n. 7, p. 1478-1481, 2007.

PALLAS, P.S. **Elenchus zoophytorum sistens generum adumbrationes generaliores et specierum cognitarum succintas descriptiones, cum selectis auctorum synonymis**. Hagae: Petrum, 1766. 451 p.

PILE, A.J.; PATTERSON, M.R.; WITMAN, J.D. In situ grazing on plankton < 10 μ m by the boreal sponge *Mycale lingua*. **Marine Ecology Progress Series**, Luhe, v. 141, p. 95-102, 1996.

PIEL, J.; D.Q.; HUI, G.P.; WEN, D.; BUTZKE, M.; PLATZER, N.; FUSETANI, S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 46, p. 16222-16227, 2004.

PIMENTEL-ELARDO, S.M.; KOZYTSKA, S.; BUGNI, T.S.; IRELAND, C.M.; MOLL, H.; HENTSCHEL, U. Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. **Marine Drugs**, London, v. 8, n. 2, p. 373-380, 2010.

PINHEIRO, U.S.; HAJDU, E. Shallowwater *Aplysina Nardo* (Aplysinidae, Verongida, Demospongiae) from the São Sebastião Channel and its environs (Tropical southwestern Atlantic), with the description of a new species and a literature review of other Brazilian records of the genus. **Revista Brasileira de Zoologia**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 143-160, 2001.

ROWBOTHAM, T.J.; CROSS, T. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated Actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. **Journal of General Microbiology**, London, v. 100, n. 2, p. 231-240, 1977.

SANA, T.R.; WADDELL, K.; FISCHER, S.M. A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 875, n. 2, p. 314-321, 2008.

SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary**, Reading, v. 16, p. 313-340, 1966.

SHIROKIKH, I.G.; MERZAEVA, O.V. Actinomycete complexes in the rhizosphere of winter rye on soddy podzolic soil. **Microbiology**, New York, v. 74, n. 2, p. 271-277, 2005.

SUJATHA, P.; RAJU, K.B.; RAMANA, T. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Research**, New York, v. 160, n. 2, p. 119-126, 2005.

SUN, W.; DAI, S.; JIANG, S.; WANG, G.; LIU, G.; WU, H.; LI, X. Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 98, p. 65-75, 2010.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAN, G.Y.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Exploration of Amycolatopsis diversity in soil using genus-specific primers and novel selective media. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v. 29, n. 7, p. 557-569, 2006.

TERKINA, I.A.; DRIUKKER, V.V.; PARFENOVA, V.V.; KOSTORNOVA, T. The biodiversity of actinomycetes in Lake Baikal. **Microbiology**, New York, v. 71, n. 3, p. 346-349, 2002.

THIEL, V.; IMHOFF, J.F. Phylogenetic identification of bacteria with antimicrobial activities isolated from Mediterranean sponges. **Biomolecular Engineering**, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 421-423, 2003.

THURMAN, H.V. **Introductory oceanography**. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 544 p.

TOMIOKA, H.; KAGAWA, M.; NAKAMURA, S. Some enzymatic properties of 3 β -hydroxysteroid oxidase produced by *Streptomyces violascens*. **Journal of Biochemistry**, London, v. 79, n. 5, p. 903-915, 1976.

TRAVASSOS, P.; HAZIN, F.H.V.; ZAGAGLIA, J.R.; ADVÍNCULA, R.; SCHOBER, J. Thermohaline structure around seamounts and islands off North-Eastern Brazil. **Archives of Fisheries and Marine Research**, Praha, v. 47, n. 2, p. 211-222, 1999.

TURNER, S.; PRYER, K.M.; MIAO, V.P.; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryote Microbiology**, Lawrence, v. 46, n.4, p. 327-338, 1999.

VACELET, J.; DONADEY, C. Electron-microscope study of association between some sponges and bacteria. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 301-314, 1977.

VIEGELMANN, C.; MARGASSERY, L.M.; KENNEDY, J.; ZHANG, T.; O'BRIEN, C.; O'GARA, F.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomic profiling and genomic study of a marine sponge-associated *Streptomyces* sp. **Marine Drugs**, London, v. 12, n. 6, p. 3323-3351, 2014.

VILLAS-BÔAS, S.G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 24, n. 5, p. 613-646, 2005.

WAKSMAN, S.A.; HENRICI, A.T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 337-341, 1943.

WARD, A.C.; BORA, N. Diversity and biogeography of marine Actinobacteria. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 9, n. 3, p. 279-286, 2006.

WEON HY, S.P.; KROPPESTEDT, R.M.; KIM, B.Y.; SONG, J.; KWON, S.W.; GO, S.J.; STACKEBRANDT, E. *Terrabacter aerolatus* sp. nov., isolated from an air sample. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 9, p. 2106-2109, 2007.

WIEDENMAYER, F. **Shallow water sponges of the western Bahamas**. Basel; Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1977. 287 p.

WILSON, R.A.; TALBOT, N.J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. **Nature Reviews**, London, v. 7, p. 185-195, 2009.

XIE, Q.Y.; WANG, C.; WANG, R.; QU, Z.; LIN, H. P.; GOODFELLOW, M.; & HONG, K. *Jishengella endophytica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, n. 5, p. 1153-1159, 2011.

ZHANG, G.; TINGFENG, C.; JIANXI, Y.; YANLIU, Y.; LINGQI, M. Diversity and novelty of actinobacteria in Arctic marine sediments. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, n. 4, p. 743-754, 2014.

5 ATIVIDADE HERBICIDA DO COMPOSTO BUTENOLIDA PRODUZIDO PELO *STREPTOMYCES* SP. ASPSP 103

Resumo

Cerca de 70 % dos antibióticos em uso clínico atualmente são provenientes de Streptomyces quais são reconhecidos produtores de compostos para diversos usos na indústria farmacêutica. O uso desses microorganismos ou seus compostos na agricultura ainda é inexpressivo, apesar dos agroquímicos sintéticos estarem menos eficientes principalmente no setor de herbicidas devido à resistência de plantas daninhas. Poríferas são animais filtradores, portanto, considerando que micro-algas presentes em ambientes marinhos possam obstruir os porócitos asfixiando a esponja, microorganismos que interajam com esses animais possivelmente produzem compostos algicidas. Acredita-se que estes compostos tenham ação herbicida por meio de mecanismo de fitotoxicidade. Desse modo, a identificação de um composto com atividade herbicida proveniente de *Streptomyces* é a proposta deste estudo. O extrato do *Streptomyces* ASPSP 103 isolado da esponja marinha *Aplysina fulva* foi testado para atividade algicida contra a microalga *Selenastrum capricornutum* e então, testado para atividade herbicida onde foi verificado a correlação de atividade para ambos os bioensaios. Foi verificada atividade herbicida pré-emergência em *Lactuca sativa* (dicotiledônea) e *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea). A purificação do extrato bruto para o isolamento do composto bioativo foi guiado por bioensaio contra *Pythium aphanidermatum*, um oomiceto de rápido crescimento e sensível aos metabólitos de ASPSP 103 previamente testados. O composto identificado como pertencente à classe butenolida, possui atividade herbicida pré-emergência contra *A. stolonifera* (IC₅₀ 33.43 µg/mL). Este é o primeiro relato da atividade de butenolida para atividade herbicida pré-emergência em monocotiledônea. Estes resultados enfatizam o potencial de *Streptomyces* marinhos para produzir compostos bioativos para o desenvolvimento de novos agroquímicos.

Palavras-chave: *Selenastrum capricornutum*; Herbicida; Pré-emergência; *Agrostis stolonifera*

Abstract

About 70% of the antibiotics in clinical use today are derived from Streptomyces in which compounds are used in pharmaceutical industry. The use of these microorganisms or their compounds in agriculture is still unimpressive, despite the synthetic agrochemicals are less efficient especially in herbicides sector because of weed resistance. Whereas microalgae present in marine environments can clog the pores stifling sponge, microorganisms that interact with these animals possibly produce compounds algacides. It is believed that these compounds have herbicidal action through fitotoxicidade. Thus, the identification of a compound having herbicidal activity from *Streptomyces* is the purpose of this study. The *Streptomyces* extract ASPSP 103 isolated from the marine sponge *Aplysina fulva* was tested for algacide activity against microalgae *Selenastrum capricornutum* and then tested for herbicide activity where the activity correlation was observed for both bioassays. Pre-emergence herbicide activity was observed in *Lactuca sativa* (dicot.) and *Agrostis*

stolonifera (monocot). Purification of the crude extract for the isolation of bioactive compound was guided by bioassay against *Pythium aphanidermatum* an oomycete fast growing and sensitive to metabolites ASPSP 103 previously tested. The compound identified as belonging to butenolida class contains pre-emergence herbicidal activity against *A. stolonifera* (IC₅₀ 33.43 mg / mL). This is the first report of butenolida activity for pre-emergence herbicide activity in monocot. These results emphasize the potential of marine *Streptomyces* to produce bioactive compounds for the development of new agricultural chemicals.

Keywords: *Selenastrum capricornutum*; Herbicide; Pre-emergence; *Agrostis stolonifera*

5.1 Introdução

Grande parte dos produtos naturais bioativos é utilizada na área médica, entretanto, a agricultura pode se beneficiar desses compostos que possuam funções pesticidas como inseticidas, nematicidas, larvicidas, repelentes, antiparasíticos, acaricidas, algicidas e principalmente herbicidas com propriedades fitotoxinas (BÉRDY, 2005). Herbicidas e outros agroquímicos sintéticos que dominaram o setor agrícola há anos têm sido retirados do mercado devido a questões de segurança ambiental e da saúde humana e também pelo rápido processo de resistência dos patógenos e plantas daninhas a essas substâncias (HEAP; 2014; DAYAN; DUKE, 2014). Desse modo, é crescente a necessidade de descoberta de novos herbicidas com baixa toxicidade ambiental e com novos mecanismos de ação. Este grande desafio para a agricultura tradicional e orgânica pode ser superado com a busca de moléculas de origem natural produzidos em especial por estreptomicetos. A diversidade estrutural e evolução da atividade biológica de moléculas produzidas por estes microorganismos oferecem uma gama de possibilidades de fitotoxinas que podem ser utilizadas como modelo para o desenvolvimento de compostos químicos sintéticos com novos mecanismos de ação (TULIP; BOHLIN, 2005).

A maioria desses microorganismos que produzem compostos com ações conhecidas foram isolados de ambientes terrestres. Atualmente, devido à grande dificuldade em se isolar novas espécies e, conseqüentemente novos compostos bioativos, a busca de micro-organismos deve ser feito em ambientes pouco explorados. Neste cenário destacam-se os oceanos, pois possuem uma grande diversidade de eucariotos e procariotos ainda pouco conhecida e explorada. Neste habitat destacam-se as esponjas marinhas que estão na vanguarda como fonte para

descoberta de produtos naturais bioativos devido à sua natureza fisiológica. Por serem animais sésseis e filtradores as esponjas dependem sobre tudo de defesas químicas para sustentação de sua espécie contra predação ou proteção de patógenos (BLUNT et al., 2004). Esta defesa ocorre por meio de uma grande variedade de associações com microorganismos produtores de metabólitos bioativos, que outrora acreditava-se serem produzidos pelas esponjas marinhas (TAYLOR et al., 2007). Desta intrínseca associação são derivados 37 % do total de novos metabólitos secundários bioativos de ambiente marinho o que torna as esponjas marinhas um estratégico recurso para bioprospecção (BLUNT et al., 2004).

O objetivo deste trabalho é identificar e caracterizar compostos com atividade herbicida provenientes de espécies de *Streptomyces* isolado de *Aplysina fulva*.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Local de amostragem

O local de coleta escolhido foi o Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Devido a seu difícil acesso este é um ambiente pouco explorado e, portanto, pouco afetado pelas atividades humanas. Este arquipélago compreende uma pequena formação rochosa situada na Zona de Fratura de São Paulo, localizado a 1,010 km ao nordeste da costa brasileira no Oceano Atlântico Equatorial (0°54'57"N; 29°20'41"W). É um dos menores e mais isolados arquipélagos do planeta, com cerca de 420 metros de largura, 18 metros no ponto mais alto (CAMPOS et al., 2009). O arquipélago esta sob influência da Corrente Sul Equatorial, com correntes marinhas superficiais na direção leste para oeste, e a Subcorrente Equatorial com movimento contrário das águas a uma profundidade de 40 a 150 m (BOWEN, 1966; TRAVASSOS et al., 1999).

Amostras de esponja marinha foram coletadas a uma profundidade de 20m e imediatamente armazenadas em sacos plásticos esterilizados e hermeticamente fechados. Após o transporte para o laboratório de Microbiologia Ambiental – Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna/ SP, as amostras foram processadas. Partes do corpo da esponja foram armazenadas em etanol para identificação taxonômica por um especialista em Porífera do Museu Nacional (Dr. Fernando Coreixas de Moraes). O restante foi utilizado para o isolamento em meio seletivo. Essa coleta foi

realizada em agosto 2013 de acordo com a expedição número 385 do Programa Pró-Arquipélago/CNPq/CECIRM/Marinha do Brasil.

5.2.2 Isolamento Seletivo

As amostras foram inicialmente processadas por meio de trituração como estratégia para recuperar actinobactérias associados ao interior do corpo da esponja marinha (ABDELMOHSEN et al., 2010). Para isto pedaços de 1 cm³ do corpo da esponja foram trituradas e homogeneizadas com água marinha artificial. Após a trituração uma suspensão contendo 1 g do tecido da esponja e 9 mL de solução de água do mar estéril foi preparada para cada amostra e misturada em agitador de tubo por 30 minutos.

Um pré-tratamento de exposição ao ultra-som por 40 segundos (BREDHOLDT et al., 2007) foi realizado antes do plaqueamento. Diluições seriadas da ordem de 10⁻¹ a 10⁻⁵ da suspensão inicial foram feitas e plaqueadas em meio de cultivo contendo ácido húmico e vitaminas (HVA agar), pH 7,0 suplementado com 100 µg/mL de nistatina, 100 µg/mL de cicloheximida e 50 µg/mL de ácido nalidíxico (TAECHOWISAN et al., 2003) enriquecido com NaCl 3 %. Após incubação a 28 °C por 21 dias, a colônia morfologicamente semelhante a *Streptomyces* foi purificada em meio ISP3 (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). As placas de purificação foram incubadas por 1 a 4 semanas a 25 °C. O isolado purificado foi identificado como ASPSP 103 e mantido a 4 °C em placas de ISP3 e na forma de esporos ou fragmentos de micélio em glicerol 20%, armazenado a -80°C.

5.2.3 Identificação molecular

O isolado foi repicado em 5 mL de caldo de glicose-extrato de levedura (GORDON; MIHM, 1962), seguindo-se de incubação por 72 h a 28 °C e 150 rpm. A extração do DNA total das culturas foi realizada com o kit *Ultra Clean® Microbial DNA Isolation MOBio*, de acordo com especificações do fabricante. A amplificação dogene que codifica para o rRNA 16S foi realizado como descrito por Hentschel et al. (2002) utilizando os primers 27F e 1492R. O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador 3500 *Genomic Analyzer (Applied Biosystems)*. As sequências foram comparadas com sequências de linhagens tipo utilizando o

servidor EzTaxon-e (KIM et al., 2012). A sequência do gene rRNA 16S foi depositada no banco de dados *GenBank*, com o código KR911949.

5.2.4 Obtenção dos metabólitos secundários

O isolado ASPSP 103 foi cultivado em 5 L de quatro meios de cultivo diferentes acrescidos de água artificial marinha, sendo: 1- Czapek(3 g/L de Nitrato de sódio (NaNO_3), 1 g/L de Fosfato Dipotássico (KH_2PO_4), 0.5 g/L de Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.5g/L de Cloreto de Potássio (KCl), 0.01 g/L de Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 8 g/L de extrato de levedura, 15.0 g/L de dextrose, pH 7.3); 2- GYE (10 g/L Extrato de Levedura, 10 g/L de Glicose); 3- GYE Peptonado (10 g/L Extrato de Levedura, 10 g/L de Glicose, 10 g/L Peptona), e 4- BDA (200 mL de caldo de batata, 20 g/L de Dextrose) e incubado a 28 °C, por 10 dias, sob agitação de 180 rpm. Para eliminar qualquer vestígio de células dos extratos, as culturas foram filtradas a vácuo (Sartorius), com membrana de celulose de 0,45 μm (Milipore), e centrifugadas a 9000 rpm por 30 min a 4 °C. O filtrado foi submetido, por três vezes, ao processo de extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas (SDFA), com o solvente diclorometano na proporção de 1:1 (v/v) em pH 3.0 com formação da camada aquosa, na parte inferior e orgânica, na parte superior. A fase orgânica foi adicionada de 5 % de sulfato de sódio anidro, filtrada em papel Whatman nº 4 e concentrada no evaporador rotativo (Quimis) a temperatura de 40 °C, à pressão reduzida (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001). O extrato bruto obtido foi pesado em balança analítica e armazenado a -20 °C. O extrato bruto seco do controle foi obtido através da extração do caldo de cultura sem inóculo.

5.2.5 Bioensaio de fitotoxicidade com a alga *Selenastrum capricornutum*

O bioensaio de fitotoxicidade do extrato bruto foi avaliado pela inibição do crescimento da alga *Selenastrum capricornutum*. O ensaio foi realizado em microplacas de 24 poços com volume de 5 mL, preparados em réplicas de 3 poços para cada tratamento. A quantidade celular inicial de microalga foi de aproximadamente 5×10^6 células/mL (ABS = 0,3 em 750 nm). Os tratamentos foram preparados com 1800 μL da solução do meio de cultura para micro algas (Tabela 6). Foram feitos dois controles negativos. O primeiro foi acrescido de 200 μL da

suspensão de *S. capricornutum* e o segundo com 20 µL do solvente DMSO com concentração final de 1% v/v e 180 µL da suspensão de *S. capricornutum*. O controle positivo foi preparado com 20 µL do herbicida atrazina em concentração de 10 µg/mL e 180 µL da suspensão de *S. capricornutum*. O extrato bruto do *Streptomyces* ASPSP 103 foi ressuspenso em DMSO 1% v/v e aplicado nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62.5 µg/mL. Foram utilizados 20 µL dos extratos das diferentes concentrações estabelecidas e 180 µL da suspensão de *S. capricornutum*. As placas foram incubadas a 20 °C, em luminosidade contínua de ~1300 lux. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601 PC) a 750 nanômetros (nm) durante 5 dias.

Tabela 6 - Procedimento OECD (*Guidelines for Testing Chemicals*) para preparo da solução-estoque do meio de cultivo de microalgas

Nutrientes	Quantidade (g/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de magnésio heptahidratado)	7,5
NaNO ₃ (Nitrato de sódio)	50
NH ₄ NO ₃ (Nitrato de amônio)	33
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O (Fosfato de potássio dibásico trihidratado)	5,2
CaCl ₂ .2H ₂ O (Cloreto de cálcio dihidratado)	3,5
Na ₂ CO ₃ .10H ₂ O (Carbonato de sódio decahidratado)	5,4
C ₆ H ₅ FeO ₇ (Citrato férrico)	0,6
C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O (Ácido cítrico monohidratado)	0,6
<u>Solução de elementos traço:</u>	-
H ₃ BO ₃ (Ácido bórico)	2,9
MnCl ₂ .4H ₂ O (Cloreto de manganês tetrahidratado)	1,81
ZnCl ₂ (Cloreto de zinco)	0,11
CuSO ₄ .5H ₂ O (Sulfato de cobre penta hidratado)	0,08
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O (Molibdato de amônio tetra hidratado)	0,018

5.2.6 Avaliação da atividade herbicida

A atividade herbicida do extrato do isolado ASPSP 103 foi avaliada em *Lactuca sativa* (dicotiledônea) e em *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea). Ambos são organismos modelos para bioensaios de atividade herbicida de compostos químicos (DAYAN et al., 1999). O bioensaio foi conduzido em placas de 24 poços com 4 repetições para cada concentração do extrato bruto, como segue o esquema

representativo da Figura 17. O extrato do isolado ASPSP 103 foi pesado, e solubilizado em dimetilfulfóxido (DMSO) e diluído em água ultra pura (Milli-Q®) em seis concentrações (10000 µg/mL, 1000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, e 0.1 µg/mL). Em cada poço foram semeadas 10 sementes sobre um disco de papel e 200 µL da solução com o extrato nas concentrações estabelecidas. Com a finalidade de definir a concentração de DMSO não tóxica para as sementes foram montadas as placas controle com *Lactuca sativa* e *Agrostis stolonifera* com concentrações de 1 a 50 % de DMSO. O herbicida comercial pré-emergente GOAL® foi utilizado como controle positivo em quatro poços. Para teste de viabilidade e germinação das sementes, foi montado em quadruplicata poços contendo somente água como controle negativo. As placas foram incubadas a 25 °C por 10 dias, em luminosidade de ~1300 lux com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro. As sementes germinadas foram contadas para o cálculo da Metade da Concentração Máxima Inibitória (IC₅₀) para avaliar a atividade herbicida de acordo com o protocolo descrito por Dayan et al. (1999) e Herath et al. (2008).

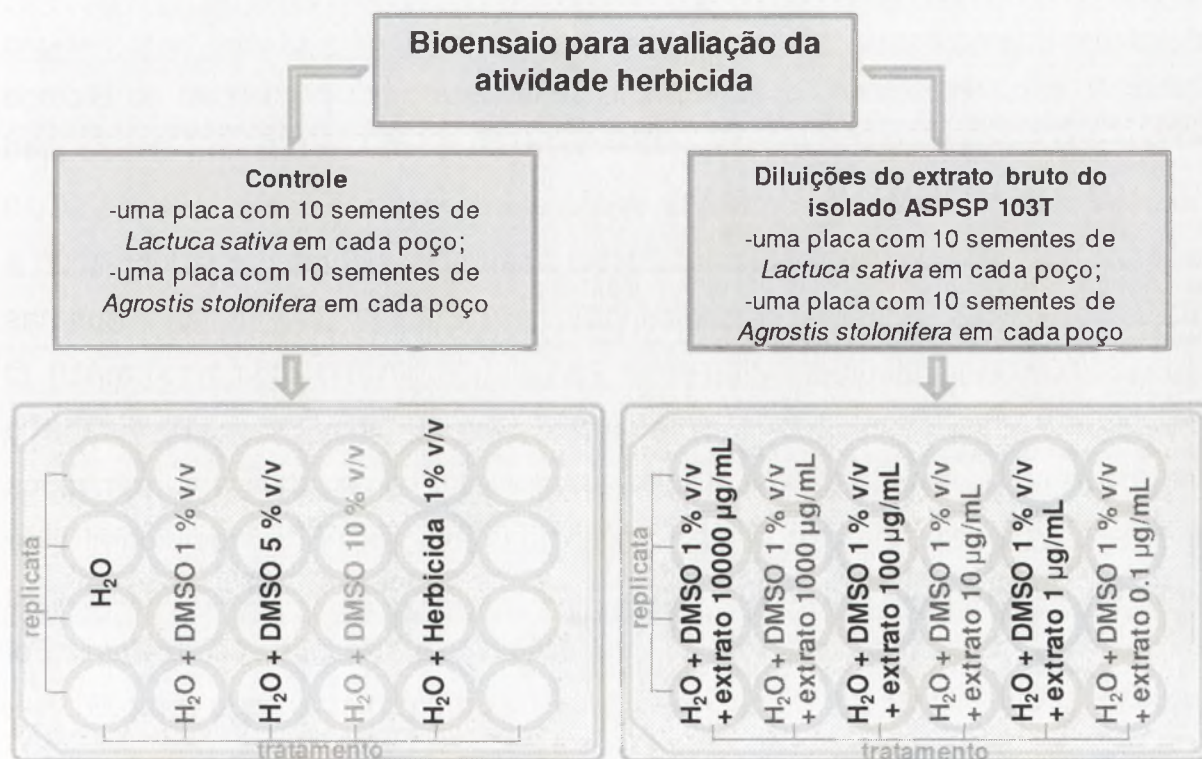


Figura 17 - Esquema representativo do bioensaio para atividade herbicida do extrato bruto do isolado ASPSP 103

5.2.7 Caracterização química dos compostos bioativos do extrato bruto de *Streptomyces* ASPSP 103

Inicialmente o *Streptomyces* ASPSP 103 foi fermentado em 20 L do meio de cultivo GYE + Peptona. 1,05 g do extrato bruto extraído em diclorometano (DCM) foi dissolvido em solução aquosa de metanol (MeOH/H₂O, 90:10, v/v) e submetido a partição líquido/líquido com 150 mL de Hexano (3 vezes). Para a partição do restante (MeOH/H₂O, 90:10, v/v) adicionou-se 57 ml de H₂O para torná-lo 70:30 (v / v) de MeOH/H₂O. Em seguida, foi adicionado 150 mL de clorofórmio (3 vezes) para obtenção da fração CHCl₃. O restante de MeOH foi removido em rotaevaporação, seguindo-se da adição de 100 mL de acetato de etila para obtenção da fração acética. O extrato aquoso restante foi evaporado novamente para remoção de todos os produtos orgânicos residuais, para obtenção do extrato na polaridade da água por meio de liofilização. As frações purificadas por partição foram submetidas ao bioensaio com *Pythium aphanidermatum*, por ser um microorganismo de crescimento rápido e sensível aos compostos produzidos por ASPSP 103 previamente testados. O extrato purificado com clorofórmio obteve forte inibição contra *P. aphanidermatum*, portanto, foi submetido a nova purificação no Biotage XP-Sil, com cartucho SNAP de 100g (40–63 µm, 60 Å, 40 Å ~ 150 mm) corrido a 40 mL min⁻¹ com gradiente de acetato de etila:acetona começando com 100:0 a 90:10 com 924 mL coletados, seguido por 90:10 a 80:20 com 298 mL coletados, 80:20 a 50:50 com 400 mL coletados e terminando com 0:100 com 350 mL coletados nas condições de comprimento de onda entre 254 nm (66 mAU) a 280 nm (51 mAU). O volume de 22 mL foi automaticamente coletado em 60 tubos de ensaio durante o fracionamento do extrato. O volume dos tubos foram combinados e concentrados com base na similaridade de bandas observadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD). Desta forma, foram separados 7 grupos, que após concentrados foram submetidos ao bioensaio com *P. aphanidermatum*. Foi observada forte inibição de *P. aphanidermatum* no grupo caracterizado como G1.

5.2.8 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica e preparativa e frações por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Após a purificação do Biotage a fração ativa G1 (50 mg) proveniente da partição clorofórmica do extrato bruto de *Streptomyces* ASPSP 103, foi primeiramente analisada por CLAE-UV em modo analítico, e em seguida, submetida ao processo de purificação usando um equipamento Shimadzu equipado com uma controladora CBM-20A, 2 bombas LC-6AD e injetor de amostra manual Rheodyne, detector UV-vis SPD-20A e degaseificador DGU-20A5. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna cromatográfica C₁₈ Shim-Pack Shimadzu (250 x 20 mm, 5 µm o diâmetro da partícula). A fase móvel consistiu de H₂O (solvente A) e Metanol + 0.1% de ácido fórmico (solvente B). A separação dos compostos foi realizada em modo gradiente de 40 a 95% de Metanol a uma vazão de fluxo de 18,0 mL/min. O progresso da análise foi monitorado nos comprimentos de onda de 220 e 340 nm. No total, 36 frações foram coletadas da análise por CLAE preparativa. Em seguida, essas frações foram analisadas e reunidas por CCDC usando como fase móvel uma mistura de solventes de polaridade crescente (hexano – acetato de etila – metanol). Como fase estacionária foi utilizada placas pré-fabricadas de sílica gel 60 (Merck, Whitehouse Station, NJ), as quais foram visualizadas sob a pulverização de revelador cromogênico (vanilina sulfúrica e H₂SO₄ em etanol) e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 364 nm. Posteriormente, as frações reunidas com base em seus perfis cromatográficos foram submetidas aos bioensaios com *P. aphanidermatum*.

5.2.9 Análise das amostras por espectrometria de massas (EM)

A análise por EM via inserção direta do extrato bruto do isolado ASPSP 103, da fração ativa G1 e subfração ativa Fr 17-20 foi realizado usando um sistema ACQUITY UPLC *H-Class* acoplado aos detectores de arranjo de diodos (do inglês, *Diode Array Detector* – DAD) e ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, USA), equipado com uma fonte de ionização Z-spray operando em modo positivo de análise. As amostras foram preparadas em MeOH/H₂O 80:20 (v/v) e subsequentemente, um volume de 3 µL de

amostra foi injetada dentro da fonte de ionização por eletrospray (do inglês, *electrospray ionization* – ESI) em modo de análise *Full-Scan* (ESI-EM).

Análises do extrato bruto do *Streptomyces* ASPSP 103 e a fração ativa G1 também foram realizados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLUE-EM). Um volume de 5 μL de amostra foi injetada em uma coluna Ascentis[®] Express C₁₈ (100 x 4,6 mm, 2,7 μm o diâmetro da partícula) da Supelco. A fase móvel consistiu de 10 mM de Acetato de Amônio (solvente A) e Metanol + 10 mM de Acetato de Amônio (solvente B). A separação dos compostos foi realizada em modo gradiente de 40 a 95% de Metanol a uma taxa de fluxo de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização Z-spray foram: voltagem do capilar = 3.2 kV, voltagem do cone = 40 V, source offset = 60 V, temperatura da fonte Z-spray = 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N₂ = 300 °C, fluxo do gás de dessolvatação = 600 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise *Full-scan* foi de 100 a 1000 unidades de massa (u). Os experimentos de espectrometria de massas tandem (CLUE-EM/EM) foram realizados por dissociação induzida por colisão (DIC) usando argônio como gás de colisão para os íons precursores de interesse ($[M + H]^+$).

5.2.10 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN)

Análise por RMN de hidrogênio (RMN de ¹H) e RMN bidimensional (COSY - correlation spectroscopy; gHSQC - gradient-enhanced heteronuclear multiple quantum coherence e HMBC - gradient-enhanced heteronuclear multiple bond correlation) da subfração ativa Fr 17-20 foi realizada em um espectrômetro Bruker DRX 500 operando em 500 e 125 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente. Aproximadamente 4,0 mg de amostra foi dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl₃, Sigma-Aldrich) e submetida aos experimentos de RMN de ¹H, gHSQC e gHMBC.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Identificação da esponja marinha

Amostras da esponja foram morfologicamente e anatomicamente caracterizadas por identificação taxonômica, realizada por comparação de descrição de espécies da literatura especializada (WIEDENMAYER, 1977; MORAES, 2011) e por espécimes de referência da Coleção de Porífera do Museu Nacional, Rio de Janeiro Brasil. Desta forma a esponja marinha foi identificada como pertencente à espécie *Aplysina fulva* (PALLAS, 1976), descrita na literatura por serem organismos produtores de lecitinas com propriedades hemoaglutinantes e derivados de dibromotirosinas com atividade citotóxica e antimicrobiana (PINHEIRO; HAJDU, 2001).

5.3.2 Isolamento Seletivo e Identificação molecular

O isolamento de espécimes do gênero *Streptomyces* neste estudo foi bem sucedido ao se utilizar os métodos para recuperar actinobactérias associadas ao interior do corpo da esponja marinha propostos por Abdelmohsen et al. (2010) e pré-tratamentos para seleção de gêneros raros de actinobactérias proposto por Bredholdt et al. (2007).

O resultado da análise da sequência quase completa (99.5% de cobertura) do gene que codifica para o rRNA 16S do isolado ASPSP 103 (1466 pb, GenBank KR911949) mostrou baixa similaridade com as seguintes espécies de *Streptomyces*: *Streptomyces violascens* ISP 5183^T AY999737 (97,7% - 39 nucleotídeos de diferença); *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T AB184868 (97,15% - 41 nucleotídeos de diferença); *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916^T AB184243 (96,77% - 47 nucleotídeos de diferença); *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455^T Z76676 (96,76% - 47 nucleotídeos de diferença); *Streptomyces daghestanicus* NRRL B-5418^T DQ442497 (96,56% - 50 nucleotídeos de diferença) e *Streptomyces koyangensis* VK-A60^T AY079156 (96,35% - 53 nucleotídeos de diferença).

A análise filogenética da sequência do gene que codifica o rRNA 16S do isolado ASPSP103 mostrou uma proximidade evolutiva ao *Streptomyces violascens* ISP 5183^T AY999737. Contudo, essa similaridade foi de apenas 97,7 %, o que indica

que a linhagem analisada neste estudo possivelmente seja integrante de uma nova espécie do gênero *Streptomyces*. *S. violascens* foi primeiramente isolado de solo (SHIRLING; GOTTLIEB, 1968), porém em recentes estudos têm sido relatado como um micro-organismo frequentemente encontrado em ambiente marinho (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010; VIEGELMANN et al., 2014). *S. violascens* é descrito pela grande produção de antibióticos, tais como actinomicina D e actinomicina X2, (EL-TARABILY et al., 2006); inibidores de protease, tais como inibidores de tripsina e quimotripsina (JONSSON; TORSTENSSON, 1972) e 3- β -hidroxiesteróide-oxidase (TOMIOKA et al., 1976). Este arsenal de antibióticos é efetivo contra uma gama de linhagens de micro-organismos. Viegelmann et al. (2004) observou que *S. violascens* inibiu o crescimento de: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus* e *Kluyveromyces marxianus*. De acordo com o sequenciamento do genoma de *S. violascens* (Acesso GenBank PRJNA180938), existem 534 contigs com uma dimensão total de 7,2 Mb; totalizando 6722 genes que codificam 6647 proteínas, 31 módulos gênicos de NRPS e 25 módulos gênicos de PKS que em adição a outros genes reguladores são responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários (VIEGELMANN et al., 2014).

5.3.3 Avaliação da atividade algicida em *Selenastrum capricornutum*

S. capricornutum é uma alga clorófitica unicelular mundialmente distribuída em corpos de água doce e solos. Devido à sua natureza cosmopolita, o seu uso em estudos de ecotoxicidade é recomendado por protocolos nacionais e internacionais (JONSSON, 2005). As microalgas também têm sido utilizadas em pesquisas para desenvolvimento de agroquímicos como triagem de herbicidas, por meio da avaliação de seu crescimento frente a moléculas com diferentes mecanismos de ação (PETERSON et al., 1997; MA et al., 2006). A inibição do crescimento de microalgas é afetada principalmente pelos herbicidas inibidores da fotossíntese (MA et al., 2004, 2006). Portanto, o extrato do isolado ASPSP 103 foi testado para atividade algicida como método de pré-screening para atividade herbicida. O extrato bruto foi solubilizado no solvente DMSO 1 %, que de acordo com os testes não causou interferência no crescimento de *S. capricornutum* (Tabela 7).

Tabela 7-Valores de absorbância indicando a taxa de crescimento da microalga *S. capricornutum* para cada período de exposição aos tratamentos.

Tratamentos	Quantidade celular (5×10^6 células/mL) ^A				
	t0	24h	48h	72h	96h
Controle com meio de cultivo OECD	0,0033 ±	0,1900 ±	0,0706 ±	0,1090 ±	0,1356 ±
Controle com DMSO 1% v/v	0,0046 ±	0,0220 ±	0,0370 ±	0,0896 ±	0,1223 ±
Controle com herbicida atrasina	0,0015	0,0065	0,0045	0,0100	0,0190
Extrato ASPSP 103 1000 µg/mL	0,0050 ±	0,0130 ±	0,0116 ±	0,0066 ±	0,0023 ±
Extrato ASPSP 103 500 µg/mL	0,0020	0,0026	0,0020	0,0020	0,00057
Extrato ASPSP 103 250 µg/mL	0,0053 ±	0,0143 ±	0,0243 ±	0,0670 ±	0,0853 ±
Extrato ASPSP 103 125 µg/mL	0,0053	0,0032	0,0065	0,0177	0,0120
Extrato ASPSP 103 62,5 µg/mL	0,0080 ±	0,0313 ±	0,0343 ±	0,0983 ±	0,1246 ±
	0,0026	0,0075	0,0041	0,0081	0,0149
	0,0070 ±	0,0323 ±	0,0426 ±	0,1030 ±	0,1336 ±
	0,0017	0,0102	0,0037	0,0160	0,0110
	0,0056 ±	0,0193 ±	0,0410 ±	0,0986 ±	0,1196 ±
	0,0011	0,0102	0,0091	0,0087	0,0083
	0,0056 ±	0,0263 ±	0,0496 ±	0,1013 ±	0,1126 ±
	0,0020	0,0041	0,0098	0,0120	0,0106

^A Os dados são apresentados como a média dos valores ± desvio padrão das duplicatas

O herbicida utilizado como controle positivo (atrasina) atua como um inibidor do FSII. Os resultados demonstram que ocorreu uma inviabilidade celular da alga *S. capricornutum* após 24h de incubação com este agroquímico (Figura 18), o que pode ser constatado pela ausência de pigmentos fotossintéticos na replicata com a atrasina comparado aos controles negativos (Figura 19).

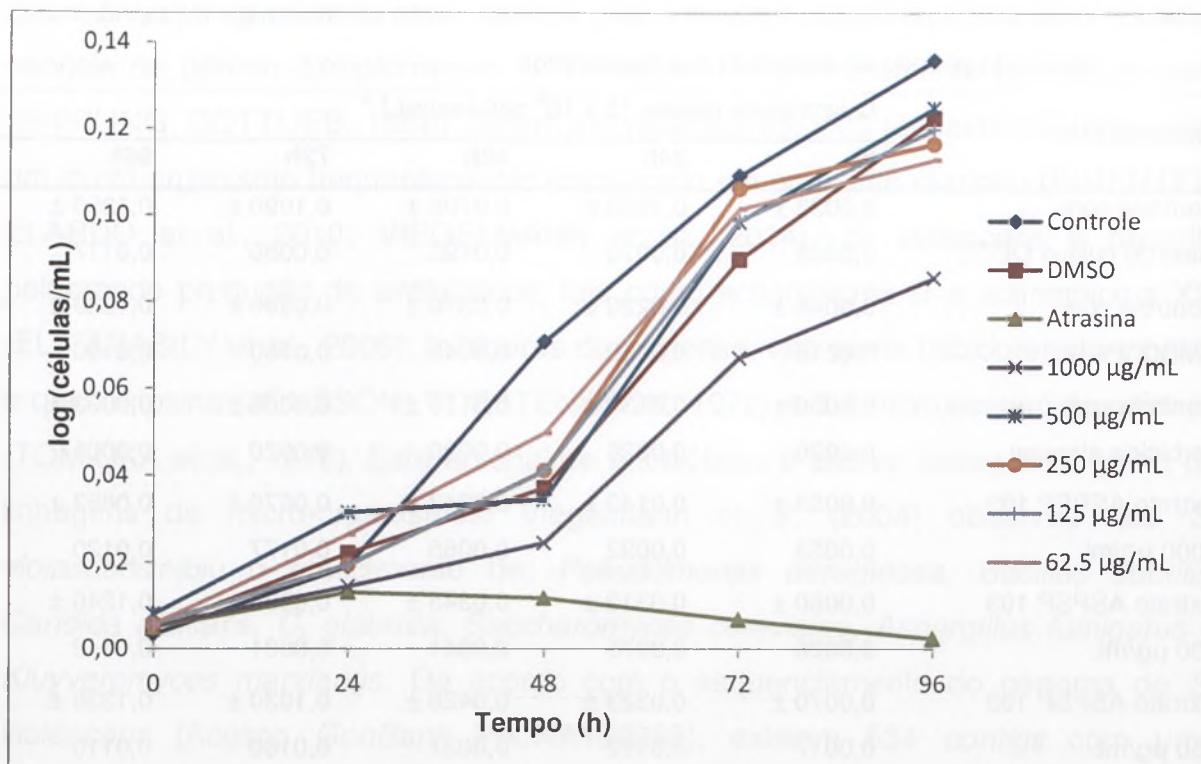


Figura 18 - Curvas de crescimento da microalga *S. capricornutum* exposta ao solvente DMSO 1% v/v, herbicida atrásina e ao extrato do *Streptomyces* ASPSP 103 em concentrações variadas

O bioensaio de fitotoxicidade com o extrato bruto do *Streptomyces* ASPSP 103 obtido da extração líquido-líquido com diclorometano foi testado em concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62.5 µg/mL. Somente a concentração de 1000 µg/mL inibiu o crescimento da alga *S. capricornutum* (Figuras 18 e 19). O leve efeito algicida observado pode ser atuante também na esponja marinha *Aplysina fulva*. Desta forma o composto bioativo produzido por este *Streptomyces* pode efetivamente proteger a esponja de incrustamento e possível asfixia por obstrução dos porócitos, por onde filtram a água periférica, absorvendo oxigênio e nutrientes.

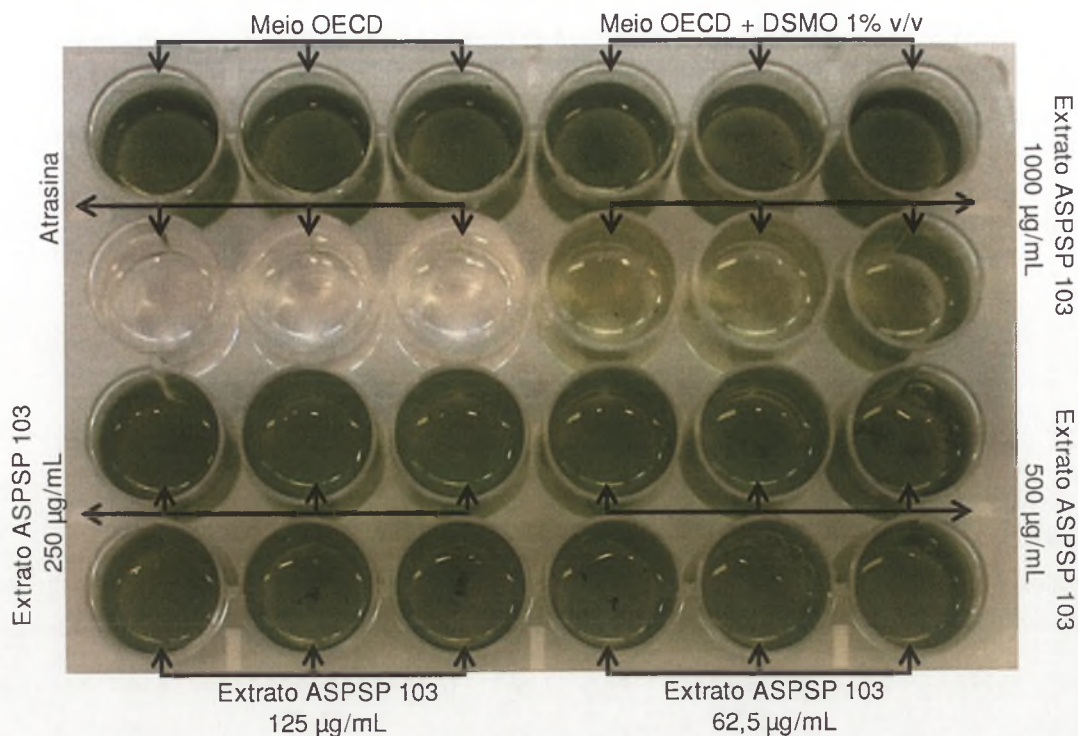


Figura 19 - Atividade algicida do extrato de *Streptomyces* ASPSP 103 contra a microalga *S. capricornutum*

5.3.4 Bioensaio para avaliação da atividade herbicida dos extratos brutos

A avaliação da atividade herbicida dos extratos em sementes de *Lactuca sativa* (dicotiledônea) e *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea), foi determinada com base na porcentagem de sementes germinadas em relação à dose aplicada, (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação da atividade herbicida pré-emergência em sementes de *Agrostis stolonifera* e *Lactuca sativa*. Cada tratamento foi conduzido em quadruplicata. Os valores representam a média da porcentagem de sementes germinadas \pm o desvio padrão. O experimento foi avaliado 10 dias após serem aplicadas diferentes concentrações do extrato bruto do *Streptomyces* ASPSP 103 extraído de diferentes meios de cultivo

Tratamentos	Concentração do extrato bruto ($\mu\text{g/mL}$)				
	1000	100	10	1	0
BDA ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	80 \pm 3,5	90 \pm 2,5	100 \pm 0
Czapek ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	70 \pm 1,5	90 \pm 2,5	100 \pm 0
GYE ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	52,5 \pm 7,07	80 \pm 5	100 \pm 0
GYE + peptona ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	20 \pm 4,08	70 \pm 4,08	100 \pm 0
BDA ^b	2,5 \pm 2,88	63 \pm 8,69	72,5 \pm 8,53	87,5 \pm 6,45	100 \pm 0
Czapek ^b	5 \pm 2,5	57,5 \pm 6,45	67,5 \pm 8,53	80 \pm 2,5	100 \pm 0
GYE ^b	0 \pm 2,5	52,5 \pm 10,3	62,5 \pm 10,4	80 \pm 6,29	100 \pm 0
GYE + peptona ^b	0 \pm 2,5	50 \pm 4,08	57,5 \pm 6,45	75 \pm 5,77	100 \pm 0
Controles*	-	-	-	-	-

^a extrato bruto do *Streptomyces* marinho ASPSP 103 aplicado em sementes de *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea)

^b extrato bruto do *Streptomyces* marinho ASPSP 103 aplicado em sementes de *Lactuca sativa* (dicotiledônea)

*Os controles foram conduzidos em quadruplicata. O tratamento com água e DMSO 1% v/v tiveram ambos taxa de germinação de 100 % tanto para *A. stolonifera* quanto para *L. sativa*. O tratamento com o herbicida pré-emergente Goal[®] ([10 $\mu\text{g/mL}$]) foi efetivo com taxa de germinação de 0% para *A. stolonifera* e para *L. sativa*

Para determinar a Concentração Máxima Inibitória (IC_{50}) foi calculado o coeficiente de regressão linear e equação de regressão da reta com base na porcentagem de inibição de germinação das sementes (Tabelas 8 e 9).

Tabela 9 - Equação da reta usada para calcular o IC₅₀ (metade da concentração máxima inibitória) da atividade herbicida pré-emergente dos extratos brutos do *Streptomyces* marinho ASPSP 103 cultivado em diferentes meios de cultivo

Extrato bruto	Equação da reta	R ²	IC ₅₀ *
BDA ^a	$y = 0.940x + 6.403$	0.989	46.37
Czapek ^a	$y = 0.915x + 9.604$	0.963	44.14
GYE ^a	$y = 0.832x + 18.76$	0.863	37.54
GYE + peptona ^a	$y = 0.813x + 19.92$	0.881	36.99
BDA ^b	$y = 0.082x + 16.64$	0.959	406.82
Czapek ^b	$y = 0.075x + 21.29$	0.851	382.8
GYE ^b	$y = 0.078x + 23.65$	0.822	337.82
GYE + peptona ^b	$y = 0.074x + 26.87$	0.781	312.56

*[IC₅₀ (µg/mL)]

^a extrato bruto do *Streptomyces* marinho ASPSP 103 aplicado em sementes de *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea)

^b extrato bruto do *Streptomyces* marinho ASPSP 103 aplicado em sementes de *Lactuca sativa* (dicotiledônea)

Na Figura 20, observa-se que todos os extratos apresentam atividade inibitória nas faixas de concentrações utilizadas no bioensaio, mostrando que o solvente escolhido neste estudo (diclorometano) foi capaz de extrair metabólitos ativos em todos meios de cultivo testados. Porém nota-se uma substancial diferença na sensibilidade aos metabólitos entre *Lactuca sativa* e *Agrostis stolonifera*. A dosagem necessária para inibição de germinação na planta dicotiledônea é acrescida em uma ordem de concentração 10 vezes maior. Este resultado ocorre possivelmente devido à diferença anatômica entre as sementes dicotiledôneas e monocotiledôneas. *Lactuca sativa* possui uma camada de tegumento e de endosperma mais espessa formando, portanto uma barreira natural para a translocação sistêmica do metabólito ao embrião da semente.

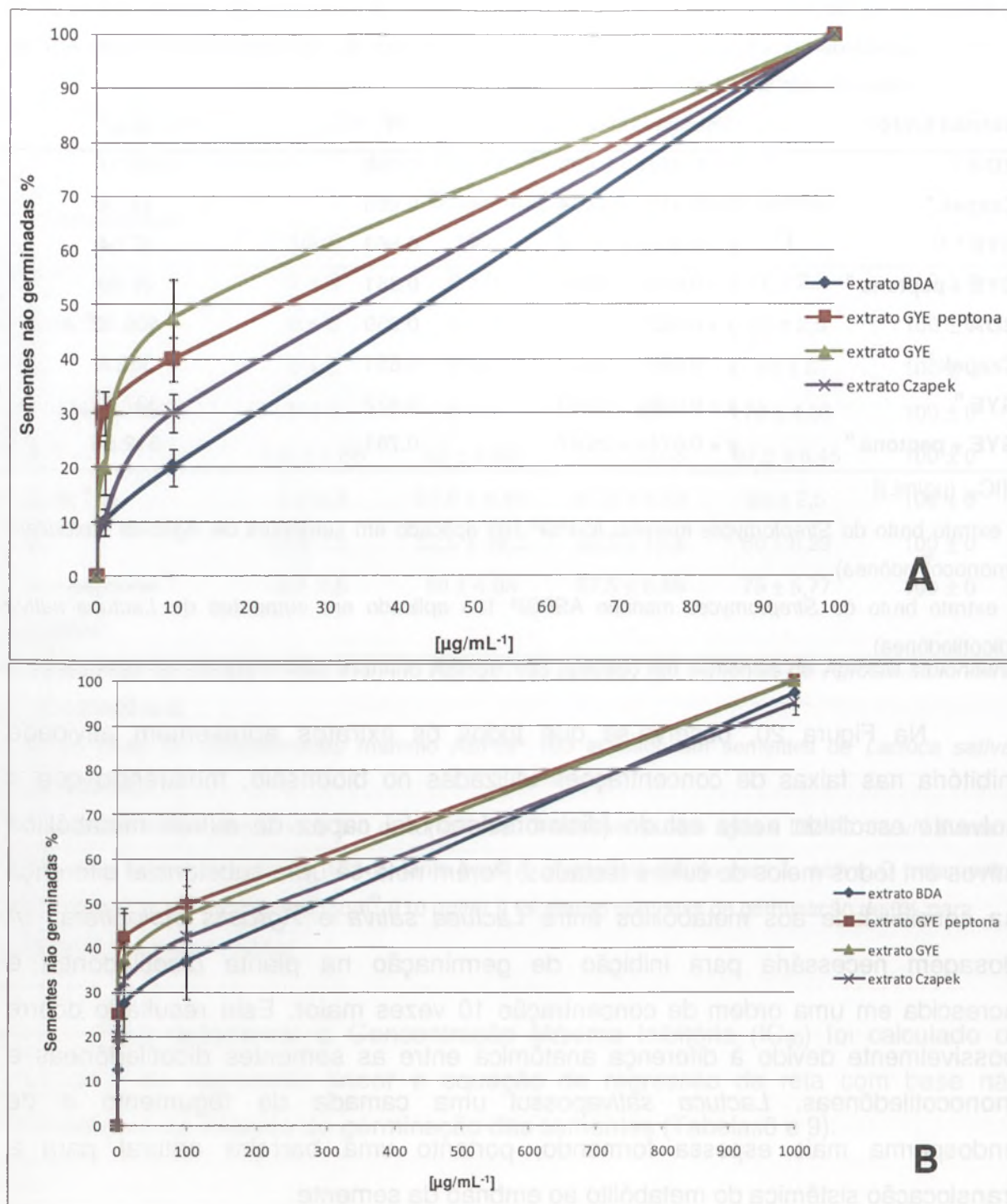


Figura 20 - Efeito da atividade herbicida pré-hermergente de extratos brutos do *Streptomyces* marinho ASPSP 103 cultivado em diferentes meios de cultivo. (A) Sementes de *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea). (B) sementes de *Lactuca sativa* (dicotiledônea)

O extrato bruto do meio GYE + peptona apresentou maior inibição da germinação em ambos os modelos de plantas testados, sendo mais sensível para monocotiledônea (Tabelas 8 e 9). O IC_{50} necessário para inativar a germinação de 50 % das sementes de *Agrostis stolonifera* variou entre 46.37 $\mu\text{g/mL}$ com o extrato

obtido do meio BDA e 36.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no extrato obtido do meio GYE + peptona. O resultado observado em sementes de *Lactuca sativa* manteve a mesma relação de atividade entre os meios de cultivo, porém com valores de IC_{50} mais altos variando de 406.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com o extrato obtido do meio BDA e 312.56 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ no extrato obtido do meio GYE + peptona.

Estudos mostram que o uso generalizado de herbicidas sintéticos para manejo de ervas daninhas resultou na disseminação de plantas altamente resistentes a herbicidas (VYVYAN, 2002; DAYAN et al., 2009). Este fato acarreta preocupações públicas sobre o impacto que os herbicidas sintéticos podem ter na saúde humana e no ambiente devido à necessidade de doses cada vez maiores para o controle plantas daninhas. Estas preocupações estão mudando a atenção das tecnologias de controle de plantas daninhas com alternativas baseadas em produtos naturais (VYVYAN, 2002). Muitos produtos naturais inibem o crescimento das plantas, e alguns destes necessitam de uma concentração relativamente baixa. O limiar de concentração necessário para a maioria dos produtos naturais que inibem o crescimento das plantas testadas em modelos experimentais similares é situado entre as faixas de concentração de 100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LOTINA-HENNSEN et al., 2013). Desta forma, os extratos analisados possuem bioatividade herbicida pré-emergente com atividade forte em monocotiledônea com dose necessária situada em uma faixa abaixo do limiar de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, bem como um efeito moderado a fraco em dicotiledônea com dose necessária situada em uma faixa abaixo do limiar de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.3.5 Análise por CLAE-UV analítico, CLAE-UV preparativo e CCDC

A fração ativa G1 (50 mg) proveniente do fracionamento do extrato bruto do *Streptomyces* ASPSP 103 em cartucho de purificação no Biotage foi analisada por CLAE-UV a fim de obter uma a separação dos compostos presentes nesta fração. Posteriormente, a fração G1 foi re-fracionada por CLAE preparativo obtendo-se 36 subfrações. As subfrações coletadas foram submetidas ao bioensaio com *P. aphanidermatum*, ao qual apenas as subfrações 18 e 19 apresentaram atividade pronunciada. As subfrações foram analisadas por CCDC e reunidas de acordo com os seus perfis cromatográficos semelhantes conforme os seus valores próximos de

R_f (fator de retenção dos compostos). Logo, essas frações foram reunidas resultando na subfração ativa Fr 17-20.

5.3.6 Análise por espectrometria de massas via ESI-EM, ESI-EM/EM e CLUE-EM

O extrato bruto de ASPSP 103, a fração ativa G1, bem como a subfração ativa Fr 17-20 foram analisados por ESI-EM em modo Full-Scan via ID-EM conforme apresentado na Figura 21.

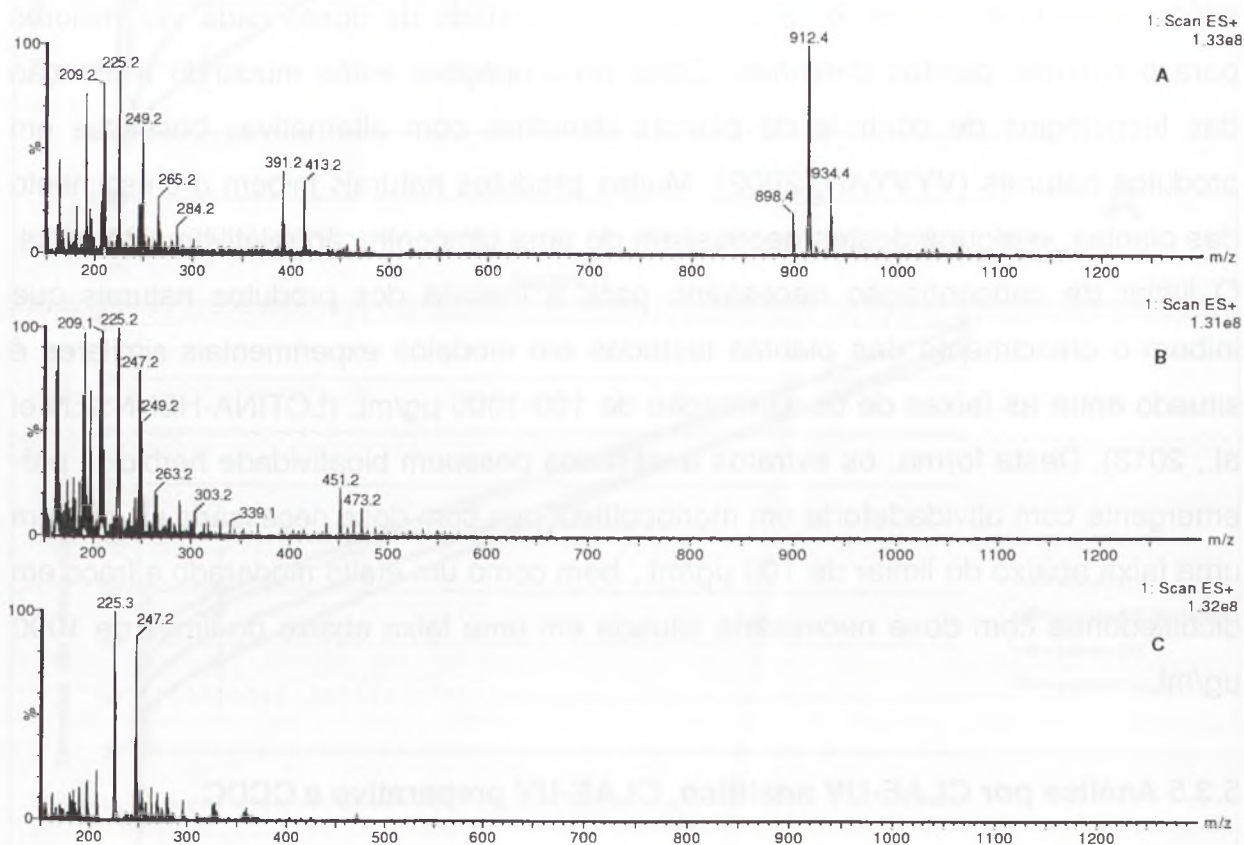


Figura 21 - Espectros de massas *Full-Scan* em modo positivo de análise: A) Extrato Bruto 103; B) Fração ativa G1; C) Subfração ativa Fr 17-20

A análise do espectro de massas revelou dois grupos maiores de picos na faixa de m/z 900-1000 e o outro na faixa de m/z 200-300. O primeiro grupo de picos possui intensidade relativa alta, de modo que a diferença de massa entre os picos é de 14 u ($-\text{CH}_2-$). Esta diferença indica a presença de compostos homólogos pertencentes à mesma classe química. Além do mais, o pico de m/z 934 possui uma diferença de massa de 22 u em relação ao pico base de m/z 912. Nesse caso, esta diferença de massa se refere aos íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 912 e $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de m/z 934.

Após o processo de purificação do extrato bruto do *Streptomyces* ASPSP 103, o qual originou a fração ativa G1, os compostos presentes na faixa de massas de m/z 900-1000 não estavam mais presentes nesta fração (Figura 21 B). Por outro lado, apenas os íons na faixa de m/z 200-300 mostraram-se evidentes no espectro de massas, bem como o íon de m/z 225 $[M+H]^+$ no espectro de massas da subfração ativa Fr 17-20 (Figura 21 C). Com intuito de obter informações estruturais dos compostos, o íon de m/z 912 e 898 foi analisado por espectrometria de massas tandem (ESI-EM/EM), conforme apresentado na Figura 22.

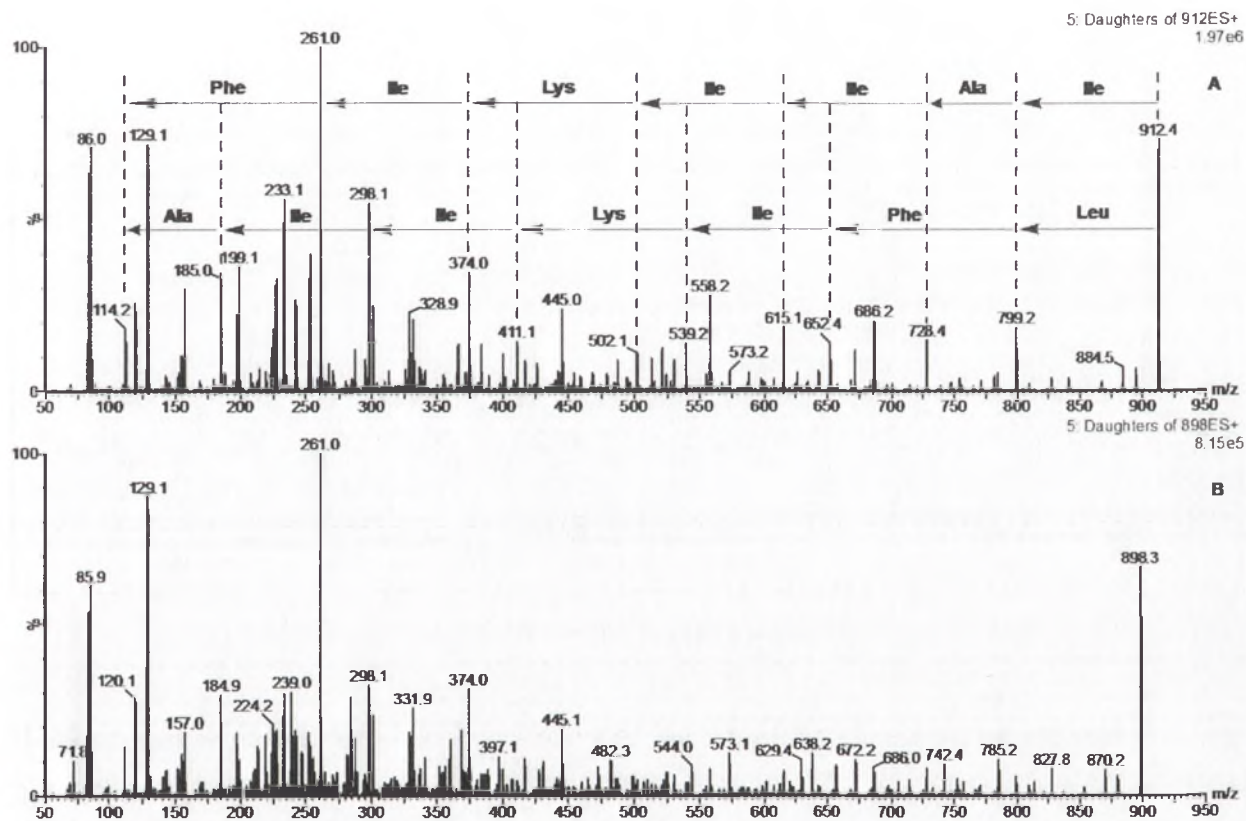


Figura 22 - Espectros de massas tandem (ESI-EM/EM) dos íons precursores protonados: A) Íon precursor de m/z 912; B) Íon precursor de m/z 898.

A identificação desses compostos foi realizada por meio da busca no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais (CHAPMAN; HALL, 2015) através da massa molecular 911 u, e confrontando as informações obtidas com o gênero *Streptomyces*, além da interpretação do espectro de ESI-EM/EM (Figura 22 A) do íon precursor de m/z 912. Dentre os 5 compostos sugeridos pelo banco de dados, a presença de um peptídeo cíclico destacou-se devido ao espectro de ESI-EM/EM (Figura 22 A) do íon precursor de m/z 912, o qual foi observado uma primeira perda

neutra de 28 u (CO), sendo comum aos peptídeos cíclicos. Subseqüentemente, outras perdas neutras referentes aos resíduos peptídicos foram identificadas. Desta forma, o composto de massa molecular 911 u foi sequenciado como sendo o ciclo[-Ile-Ala-Ile-Ile-Lys-Ile-Phe-] (Figura 23), conforme já relatado na literatura por Takada et al. (2013). Contudo, apenas o experimento de ESI-EM/EM realizado via DIC não é suficiente para distinguir entre os resíduos Ile ou Leu, uma vez que ambos são isômeros e, conseqüentemente, possuem a mesma fórmula e massa molecular.

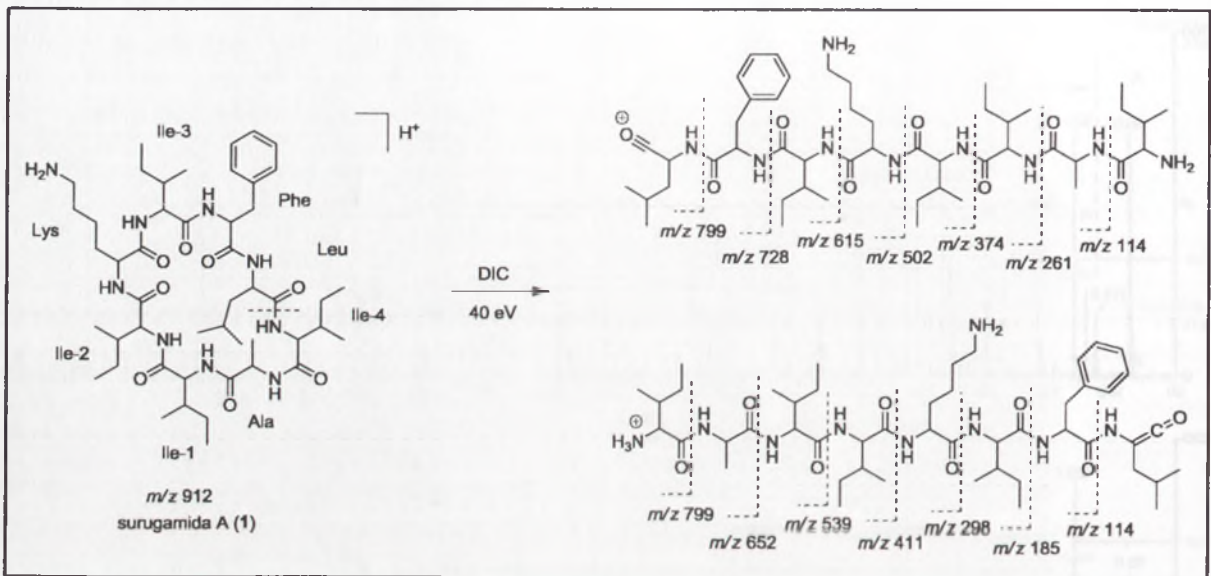


Figura 23 - Sequência de fragmentação dos resíduos peptídicos da surugamida A (1)

O íon precursor de m/z 898 presente no espectro de massas da Figura 22 B possui diferença de massa de 14 u em relação ao íon de m/z 912. Da mesma forma, o mesmo procedimento de identificação estrutural foi realizado para este composto, e o espectro de ESI-EM/EM desse íon apresentou picos semelhantes à surugamida A (1) (Figura 23), mas em mistura com outras surugamidas isoméricas. Assim, apenas com os dados obtidos por ESI-EM/EM não foi possível definir sistematicamente as outras surugamidas presentes na amostra.

Com relação aos compostos presentes na faixa baixa de massas, o íon de m/z 225 merece destaque, pois aparece como majoritário na subfração ativa Fr 17-20 (Figura 21 C). Com intuito de obter a separação eficiente dos analitos, e a identificação das massas dos compostos em seus respectivos tempos de retenção

(t_R), o extrato bruto do *Streptomyces* ASPSP 103, bem como a subfração ativa Fr 17-20 foram analisados por CLUE-EM, conforme mostrado nas Figuras 24 e 25.

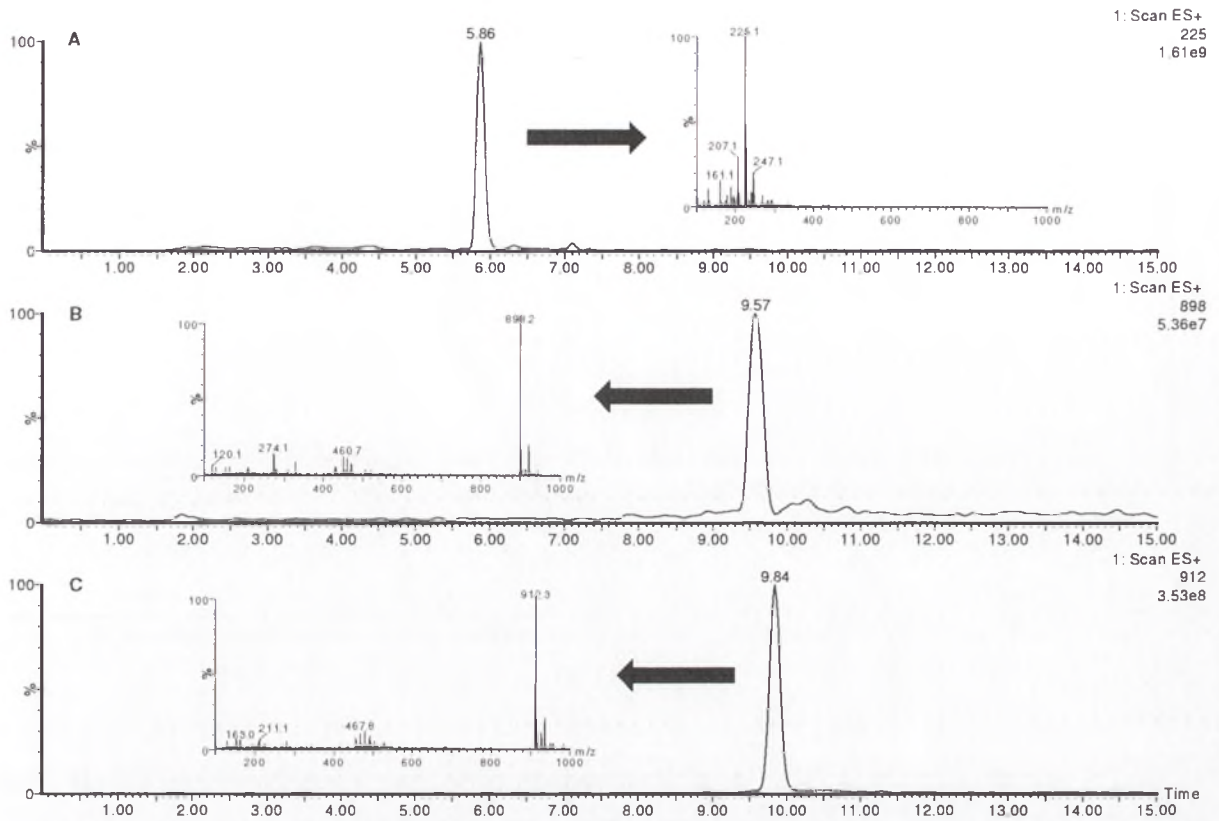


Figura 24 - Cromatogramas de íons extraídos (EIC) de A) m/z 225, B) m/z 898 e C) m/z 912, presentes no extrato bruto 103 e seus respectivos espectros de massas

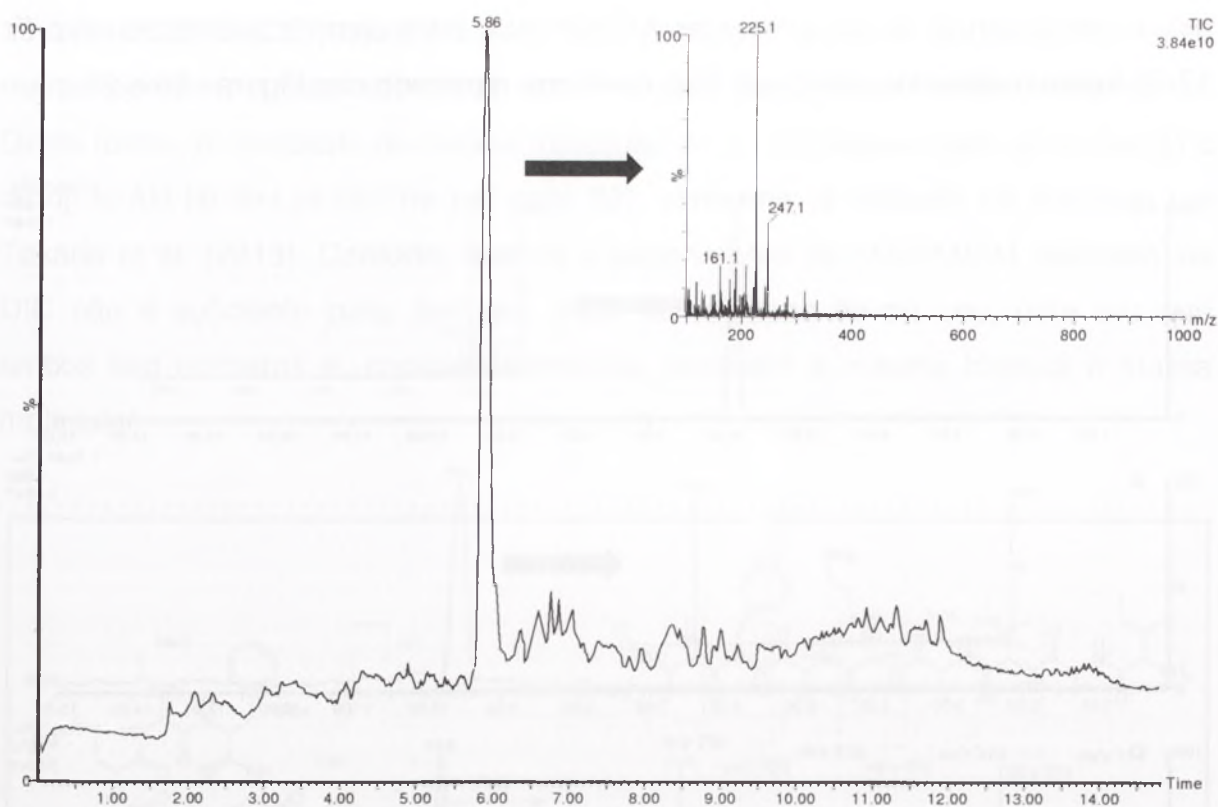


Figura 25 - Cromatograma de corrente iônica total (TIC) da subfração ativa Fr 17-20

De acordo com a Figura 24, o desenvolvimento da metodologia por CLUE-EM foi eficiente na separação dos compostos de interesse, de modo que os íons de m/z 898 e m/z 912 apresentaram perfis cromatográficos semelhantes com pequenas diferenças em seus tempos de retenção (t_R) - $t_R = 9.57$ min e 9.84 min, respectivamente. Esta análise corrobora com os dados obtidos por ESI-EM/EM mencionados acima com relação à semelhança estrutural desses dois compostos os quais são homólogos. Por outro lado, o íon de m/z 225 apresentou um perfil cromatográfico distinto com característica de um composto mais polar $t_R = 5.86$ min (Figura 24 A), e o seu espectro de massas apresentou o íon protonado $[M+H]^+$ como pico base, juntamente com a presença do seu íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ de m/z 247.

A subfração ativa Fr 17-20 oriunda do fracionamento por CLAE-UV preparativo foi analisada também por CLUE-EM, e o pico no $t_R = 5.86$ min referente ao íon de m/z 225 apresentou maior intensidade no cromatograma de corrente iônica total (TIC), conforme mostrado na Figura 25. Posteriormente, devido ao grau de pureza obtida desta amostra, a mesma foi submetida aos experimentos de RMN para caracterização estrutural do constituinte químico majoritário.

5.3.7 Análise da subfração Fr 17-20 por RMN de ^1H , COSY, gHSQC e gHMBC

A substância presente na subfração ativa Fr 17-20 foi isolada na forma de um óleo marrom por CLAE-UV preparativo. O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais na região de 1,05-7,55 ppm, conforme mostrado na Figura 26.

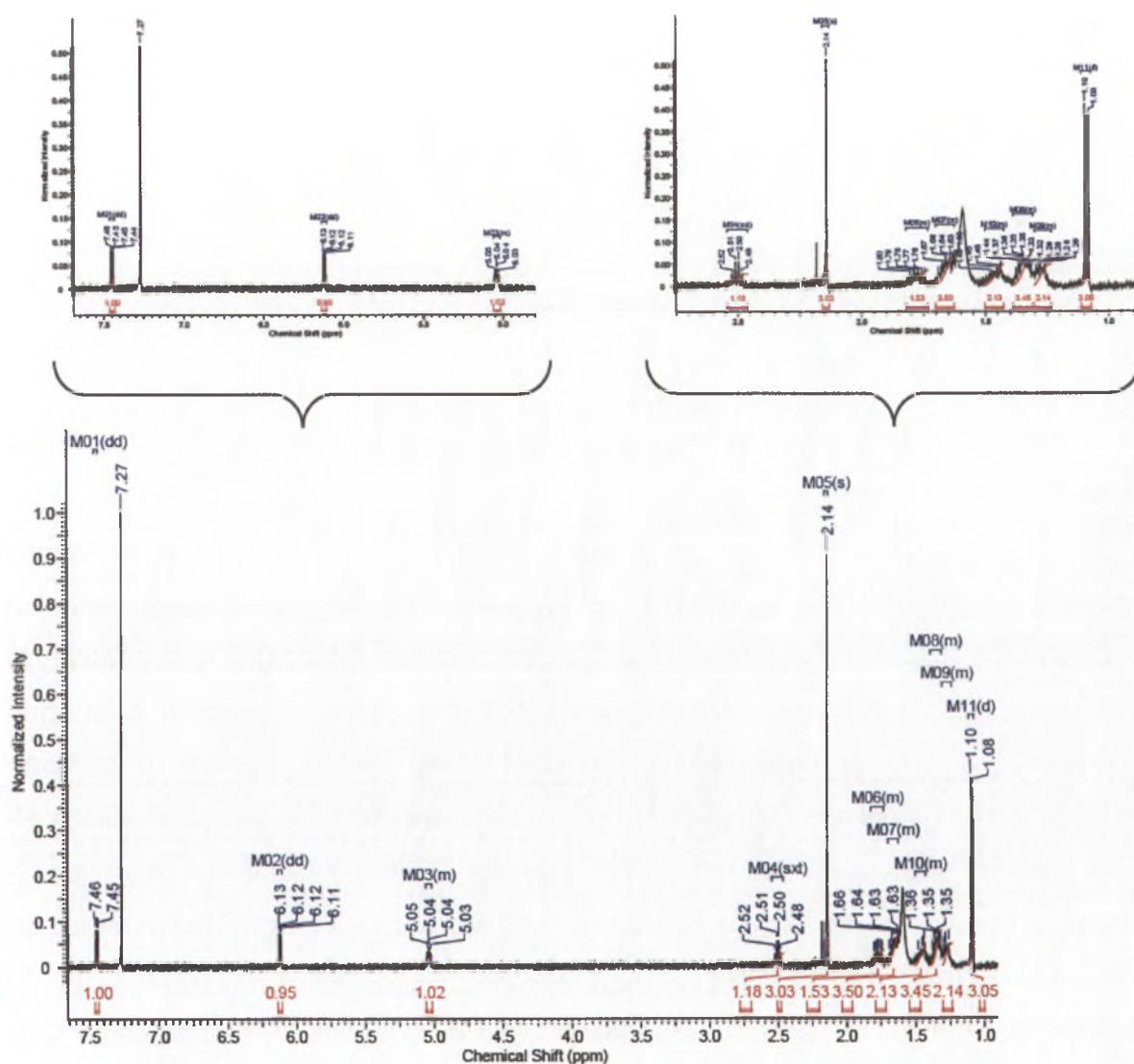


Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H da subfração Fr 17-20 (500 MHz, CDCl_3) δ 1,09 (d, $J=7,01$ Hz, 3 H), 1,23-1,30 (m, 2 H), 1,31-1,39 (m, 4 H), 1,43-1,50 (m, 2 H), 1,62-1,70 (m, 4 H), 1,73-1,82 (m, 2 H), 2,14 (s, 3 H), 2,50 (sxt, $J=6,70$ Hz, 1 H), 5,02 - 5,06 (m, 1 H), 6,12 (dd, $J=5,84, 1,95$ Hz, 1 H), 7,45 (dd, $J=5,71, 1,56$ Hz, 1 H)

A Figura 26 mostra uma complexidade dos sinais entre δ 1,0 e 2,50, referentes aos grupos metílicos, metilênicos e metínicos. Por outro lado, os sinais em δ 6,12 (1 H, dd) e δ 5,10 (1 H, m) devem ser destacados, pois, se referem

a hidrogênio olefínico e carbinólico, respectivamente, que caracterizam a presença de ligação dupla e de oxigênios na molécula. Com intuito de obter mais informações sobre a estrutura química, foram utilizadas técnicas bidimensionais de correlação ^1H - ^{13}C a curta (1J) (gHSQC, Anexo A) e a longa distância (2J e 3J) (gHMBC, Anexo B) e COSY (Anexo C). Assim, com base nas correlações e multiplicidades dos sinais apresentados, foi possível sugerir a presença da estrutura da butenolida, conforme mostrado na Figura 27.

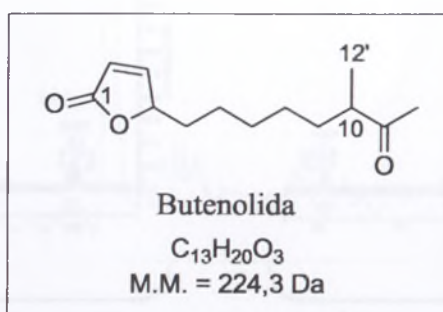


Figura 27 - Estrutura química da butenolida

No espectro de RMN de ^1H (Figura 26) o sinal em δ 1.09 pertence aos hidrogênios metílicos H-13, os quais acoplam (Anexo C) com o hidrogênio metínico H-10 dando um dubleto com constante de acoplamento $^2J = 7,0$ Hz. A análise do espectro de HMBC mostrou a correlação desses hidrogênios H-13 com o carbono carbonílico C-11 do grupamento cetona, bem como correlação com o carbono metínico C-10. O sinal em δ 2,14 (3 H, s) foi atribuído aos hidrogênios metílicos H-12, os quais mostram também uma correlação HMBC com o carbono carbonílico C-11 do grupamento cetona, e com o carbono metínico C-10. O Hidrogênio metínico H-10 em δ 2,50 mostra uma correlação HMBC com o carbono carbonílico C-11 do grupamento cetona, com o carbono metílico C-13 e com o carbono metilênico C-9. Outros sinais importantes foram observados para definir a identificação estrutural da butenolida, tais como, os sinais dos hidrogênios em δ 7,45 e 6,12, bem como o sinal de carbono atribuído por meio do espectro de HSQC em δ 173,0, os quais indicam a presença de uma lactona α,β -insaturada. Além do mais, o espectro de COSY também mostrou acoplamentos entre os dois hidrogênios (H-2 e H-3) olefínicos e entre o hidrogênio olefínico H-3 em δ 7,45 com o hidrogênio metínico H-4 em δ 5.04, indicando assim a presença de um carbono oxigenado próximo a uma ligação dupla. O hidrogênio H-4, por sua vez, também mostrou correlação HBMC com o carbono

metilênico C-5 em δ 33,0, e acoplamento com os hidrogênios metilênicos em δ 1,78 de acordo com o espectro de COSY. No espectro de HSQC, o sinal do H-4 em δ 5,04 correlacionou com o sinal do carbono metínico em δ 82,9.

A análise dos dados obtidos e comparações com dados da literatura (MUKKU et al, 2000) permitiram a caracterização da estrutura como 4-Hidróxi-10-metil-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olida. A Tabela 10 e a Figura 28 mostram os deslocamentos químicos obtidos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , bem como as correlações nos espectros bidimensionais.

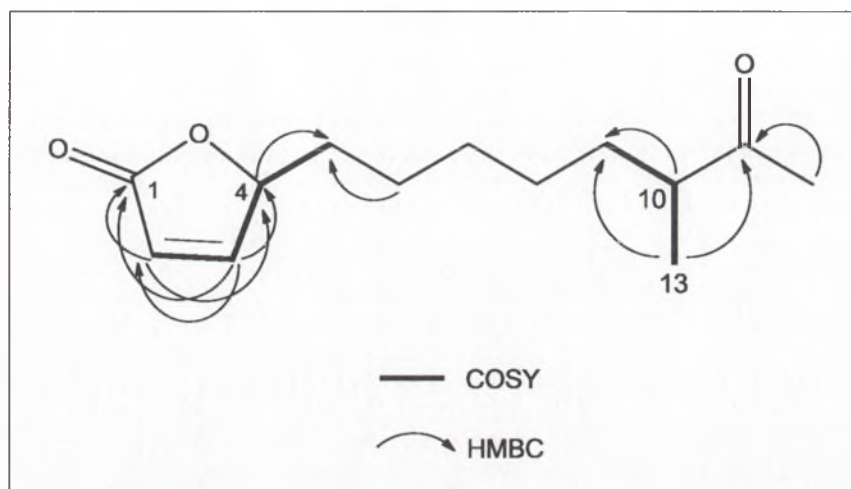


Figura 28 - Correlações mais significantes observadas nos espectros bidimensionais da butenolida

Tabela 10 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e as correlações bidimensionais observadas para a butenolida

Carbono	δC (ppm)*	δH (ppm)*	HMBC*	COSY*
1	173,0	---	H-2, H-3	---
2	121,0	6,12 (dd, $J = 5,8, 1,9$ Hz; 1H)	H-3	H-3
3	156,0	7,45 (dd, $J = 5,7, 1,6$ Hz; 1H)	---	H-2, H-4
4	82,9	5,04 (m; 1H)	H-2, H-3	H-3, H-5
5	33,0	1,78 (m; 2H)	H-4, H-6	H-4, H-6
6	24,8	1,45 (m; 2H)	---	H-5, H-7
7	29,1	1,35 (m; 2H)	---	H-6, H-8
8	27,0	1,28 (m; 2H)	H-6	H-7, H-9
9	32,5	1,66 (m; 2H)	H-10, H-13	H-8, H-10
10	47,0	2,50 (sxt, $J = 6,7$ Hz; 1H)	H-12, H-13	H-9, H-13
11	213,0	---	H12, H-13	---
12	28,0	2,14 (s; 3H)	---	---
13	16,1	1,09 (d, $J = 7,0$ Hz; 3H)	H-10	H-10

*Os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio foram obtidos do espectro de RMN de ^1H . Os espectros bidimensionais ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC e ^1H - ^{13}C -HMBC também foram usados nestas correlações

5.3.8 Atividade herbicida pré-emergência do composto butenolida

Butenolidas pertencem a uma família de lactonas α,β -insaturadas produzidas por fungos e bactérias marinhas (MUKKU et al., 2000). Seus análogos insaturados atuam como substâncias sinalizadoras em bactéria, e estimulam a formação de esporos e a produção de metabólitos secundários em *Streptomyces* (BRAUN et al., 1995; MUKKU et al., 2000). Alguns trabalhos reportam a presença de butenolidas em esponjas marinhas produzidas principalmente por espécies de *Streptomyces*

associadas, porém este composto é encontrado em concentrações muito baixas (SCHWARTZ, 2014).

Vários estudos vêm mostrando o uso das butenolidas na inibição de diversos patógenos. Pimentel-Elardo et al. (2010) observaram que isolados de *Streptomyces* de *Aplysina aerophoba*, *Axinella polypoides*, *Tedania* sp. E *Tethya* sp., produzem a molécula butenolída com bioatividade contra *Trypanosoma*, porém sem efeito tóxico contra células epiteliais do rim e macrófagos. Igarashi et al. (2014) identificaram butenolidas com atividade de inibição em Receptores Ativos de Peroxissoma (PPAR) que são fatores de transcrição que regulam o metabolismo energético sistêmico através da modulação da expressão de numerosos genes envolvidos no metabolismo de lípidos e de glicose.

Quanto ao efeito em bactérias e fungos, Mukku et al., (2000) isolaram de sedimento marinho, dois exemplares do gênero *Streptomyces* produzindo três variações da molécula butenolida com bioatividade fungicida: (4S)-4,10-Dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide; (4S)-4,11-Dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olides e (4S)-4-Hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide. Estas variações na molécula se diferenciam por pequenas alterações no radical, sem modificar, portanto, a bioatividade. Braun et al. (1995) demonstrou que a butenolida produzida por *Streptomyces antibioticus* foi a responsável pela bioatividade contra *Pseudomonas aeruginosae* também uma fraca inibição de quitinase produzida *Serratia marcescens*.

Viegelmann et al. (2014) isolaram 52 bactérias endossimbiontes da esponja marinha *Haliclona simulans*, coletada na costa Irlandesa, das quais 29 possuíam atividade contra fungos e bactérias testadas. Um isolado foi selecionado devido ao amplo espectro de antagonismo contra diversas linhagens fúngicas e bacterianas testadas. Este microorganismo foi identificado como base no gene rRNA 16S (100% de similaridade) como *Streptomyces violascens*, espécie taxonomicamente mais próxima ao isolado *Streptomyces* ASPSP 103. Esses autores identificaram três tipos de butenolidas produzidas por *S. violascens*: (1) 4,10-dihidroxi-10-metil-dodec-2-en-1,4-olide; (2) 4,11-dihidroxi-10-metil-dodec-2-en-1,4-olide; e (3) 4-hidroxi-10-metil-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide. Este perfil de butenolidas foi similar ao *Streptomyces* isolado de sedimento marinho no litoral Alemão reportado por Mukku et al. (2000). Curiosamente Viegelmann et al. (2014) observaram uma baixa concentração da butenolida tipo 3, nos extratos do microorganismos associado *S. violascens* e da

esponja hospedeira *H. simulans*, o que o levaram a deduzir que o composto possivelmente atue como defesa química ou na regulação quimiotática entre a esponja e o simbiote.

Neste estudo é reportada pela primeira vez a ação da molécula butenolida com bioatividade herbicida pré-emergência. O experimento foi conduzido com a administração de diferentes concentrações da butenolida sintetizada pelo *Streptomyces* ASPSP 103 em sementes *Lactuca sativa* (dicotiledônea) e *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea). A avaliação da atividade herbicida foi determinada com base na porcentagem de sementes germinadas em relação à dose aplicada. Não houve efeito inibitório em nenhuma concentração administrada para germinação de *Lactuca sativa*. O efeito inibitório moderado observado no bioensaio com extrato bruto mostra uma sensibilidade de *L. sativa* a outros compostos não identificados neste trabalho. A inibição de germinação de *Agrostis stolonifera* mostrou sensibilidade da gramínea à molécula butenolida como pode ser observada na Tabela 11.

Tabela 11 - Avaliação da atividade herbicida pré-emergência da molécula butenolida em sementes de *Agrostis stolonifera* e *Lactuca sativa*. Cada tratamento foi conduzido em quadruplicata. Os valores representam a média da porcentagem de sementes germinadas \pm o desvio padrão. O experimento foi avaliado 10 dias após serem aplicadas diferentes concentrações do composto butenolida + DMSO 1 % v/v

Tratamentos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)				
	1000	100	10	1	0
Butenolida ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	55 \pm 5,77	62,5 \pm 4,78	100 \pm 0
Butenolida ^b	95 \pm 2,5	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
Controles*	-	-	-	-	-

^a butenolida aplicada em sementes de *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea)

^b butenolida aplicada em sementes de *Lactuca sativa* (dicotiledônea)

*Os controles foram conduzidos em quadruplicata. O tratamento com água e DMSO 1% v/v tiveram ambos taxa de germinação de 100 % tanto para *A. stolonifera* quanto para *L. sativa*. O tratamento com o herbicida pré-emergente Goal[®] ([10 $\mu\text{g/mL}$]) foi efetivo com taxa de germinação de 0% para *A. stolonifera* e para *L. sativa*

As porcentagens de inibição de germinação das sementes de *Agrostis stolonifera* para calcular a IC_{50} encontram-se na Tabela 11.

De acordo com a avaliação da taxa de germinação foi possível observar que a molécula butenolida apresentou uma atividade herbicida pré-emergência com valores de IC_{50} de 33.43 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela12).

Tabela 12 - Equação da reta usada para calcular o IC_{50} (metade da concentração máxima inibitória) da atividade herbicida pré-hermergente do extrato de ASPSP 103 obtido do meio de cultivo GYE + peptona; extrato GYE + peptona purificado e da molécula pura (butenolida) isolada do meio GYE + peptona em sementes de *Agrostis stolonifera*

Extrato	Equação da reta	R^2	IC_{50}^*
GYE + peptona	$y = 0.813x + 19.92$	0.881	36.99
GYE + peptona purificado	$y = 0.737x + 28.28$	0.746	29.47
Butenolida	$y = 0.772x + 24.19$	0.820	33.43

*[IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)]

Este valor de IC_{50} foi ligeiramente inferior ao observado no tratamento com o extrato bruto obtido da fermentação no meio GYE + peptona (36.99 $\mu\text{g/mL}$). O resultado observado entre o extrato purificado obtido da fermentação no meio GYE + peptona e a butenolida apresentou uma pequena diferença. O valor de IC_{50} do extrato purificado foi inferior ao observado pela butenolida pura (Tabela 12 e Figura 29).

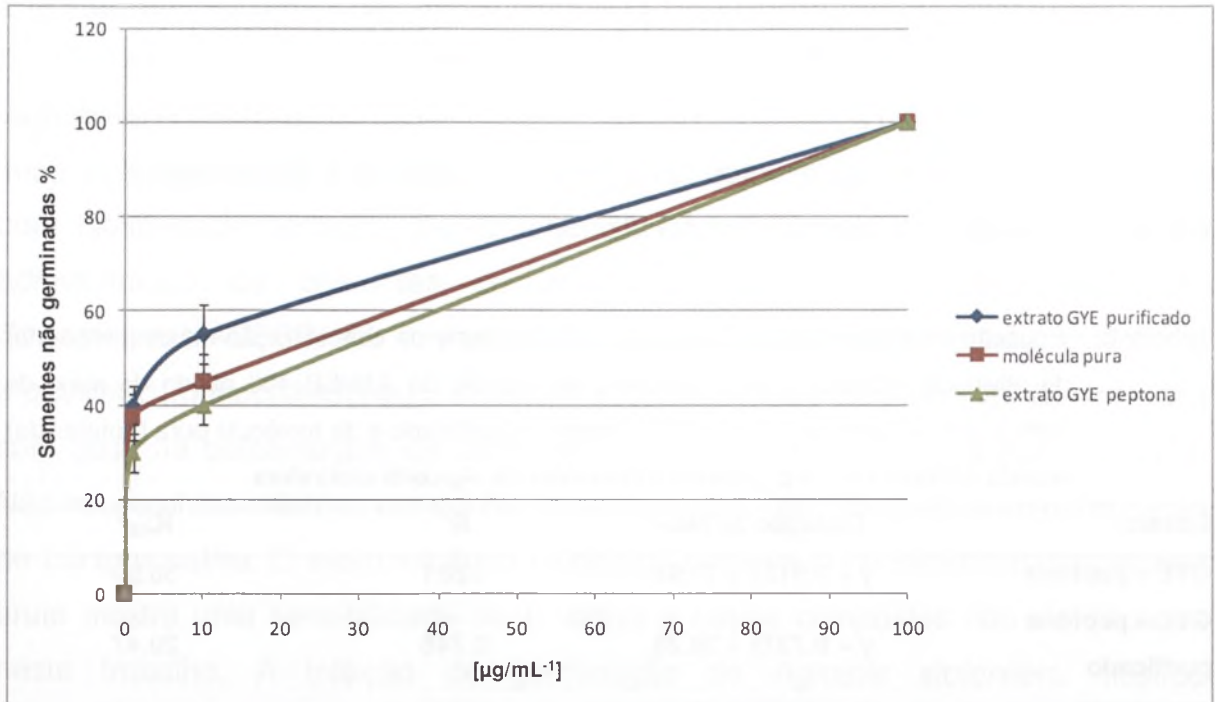


Figura 29 - Efeito da atividade herbicida pré-hermorgente do extrato de ASPSP 103 obtido do meio de cultivo GYE + peptona; extrato GYE + peptona purificado e da molécula pura (butenolida) isolada do meio GYE + peptona em sementes de *Agrostis stolonifera*

Este resultado indica um provável sinergismo entre moléculas, em que a interação de um ou mais composto pode aumentar a bioatividade observada no extrato purificado em detrimento da molécula pura. Sabe-se que espécies do *Streptomyces* possuem centenas de genes no conjunto de seu genoma que codificam metabólitos, produzindo desta forma centenas de substâncias com bioatividade (VIEGELMANN et al., 2014). O valor de IC_{50} da butenolida foi maior que o herbicida Goal utilizado como controle positivo. Goal tem como princípio ativo o Oxyfluorfen que atua como herbicida de contato para o controle de plantas daninhas gramíneas e de folhas largas, em aplicações de pré-emergência. Tem sido utilizado em 44 diferentes cultivos em todo mundo, e desde 1975 é utilizado no Brasil principalmente nas culturas de café, soja, algodão, pinus e eucalyptus, citrus, arroz e cana-de-açúcar (PEREIRA, 1987).

A Butenolida apresentou valores de IC_{50} similar aos reportados por alguns produtos naturais como Tricolorin-A, Sorgoleone e tetranorditerpenóide dilactona. Tricolorin-A é um composto extraído da planta *Ipomoea tricolor* que atua como herbicida pré-emergência em *E. crus-galli* uma monocotiledônea, com valores de IC_{50} de 36.1 µg/mL (PEREDA-MIRANDA et al., 1993). Nas monocotiledôneas *Lolium*

mutliflorum e *Triticum vulgare* tricolorin-A possui atividade com valores de IC₅₀ de 16.1 e 25.7 36.1 µg/mL respectivamente (LOTINA-HENNSEN et al., 2103). Outro composto, o Sorgoleone, é um *p*-benzoquinona isolado do exsudato da raiz de *Sorghum bicolor* e inibe a germinação e o crescimento de ervas daninhas sensíveis em concentrações tão baixas quanto 10 µg/mL. O composto tetranorditerpenóide dilactona é um precursor biossintético de vias metabólicas que atua como um putativo regulador metabólico tal como a butenolida (HERATH et al., 2009). Este composto foi isolado do extrato acético do fungo *Sclerotinia homoeocarpa* com propriedades herbicida pré-emergência (IC₅₀ de 0,95 µg/mL) para *Agrostis stolonifera*.

O limiar de concentração requerido para produtos naturais testados para inibir o crescimento de plantas em modelos experimentais está na faixa de 100-1.000 µg/mL (LOTINA-HENNSEN et al., 2103). Desta forma a butenolida sintetizada pelo *Streptomyces* ASPSP 103 possui ação herbicida em níveis aceitáveis para o mercado contra o modelo de monocotiledênea utilizada neste estudo.

Referências

- ABDELMOHSEN, U.R.; PIMENTE, S.M.; HANORA, A.; RADWAN, M.; ABOU-EL-ELA, S.H.; AHMED, S.; HENTSCHEL, U. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 3, p. 399-412, 2010.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites a personal view. **Journal of Antibiotics**, Basel, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W.P.; MUNRO, M.H., NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, London, v. 24, n. 1, p. 31-86, 2007.
- BOWEN, V.T. St. Paul's on the subway. **Oceanus**, Woods Hole, v. 12, n. 4, p. 2-4, 1966.
- BRAUN, D.; PAULI, N.; SEQUIN, U.; ZÄHNER, H. New butenolides from the photoconductivity screening of *Streptomyces antibioticus* (Waksman and Woodruff) Waksman and Henrici 1948. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 126, n. 1, p. 37-42, 1995.

- BREDHOLDT, H.; GALATENKO, O.A.; ENGELHARDT, K.; FJAERVIK, E.; TEREKHOVA, L. P.; ZOTCHEV S.B. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. **Environmetal Microbiology**, Dordrecht, v. 9, n. 11, p. 2756-2764, 2007.
- CAMPOS, T.F.C.; PETTA, R.A.; THEYE, T.; SICHEL, S.E.; SIMÕES, L.S.A.; SRIVASTAVA N.K.; MOTOKI A NETO, J.V.; ANDRADE, F.G.G. Posição ímpar do Arquipélago de São Pedro e São Paulo na diversidade geológica da Terra. In: HAZIN, F.H.V.; VIANA, D.L.; SOUZA, M.A.C. **O Arquipélago de São Pedro e São Paulo: 10 anos de Estação Científica**. Brasília: Marinha do Brasil, Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar, 2009. p. 54-63.
- CHAPMAN, C.R.C.; HALL, C.R.C. **Dictionary of natural products**. 2015. Disponível em: <<http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=11039637&props=&struct=start&si>> Acesso em: 20 maio 2015.
- DAYAN, F.E.; DUKE, S.O. Natural compounds as next-generation herbicides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, n. 3, p. 1090-1105, 2014.
- DAYAN, F.E.; CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009.
- DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, Washington, v. 26, n. 9, p. 2079-2094, 2000.
- EL-TARABILY, K.A.; SOLIMAN, M.H.; NASSAR, A.H.; AL-HASSANI, H.A.; SIVASITHAMPARAM, K.; MCKENNA, F.; HARDY, G.S. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, San Diego, v. 49, n. 5, p. 573-583, 2000.
- GORDON, R.E.; MIHM, J.M. The type species of the genus *Nocardia*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 27, n. 1, p. 1-10, 1962.
- HERATH, H.B.; HERATH, W.H.; CARVALHO, P.; KHAN, S.I.; TEKWANI, B.L.; DUKE, S.O.; NANAYAKKARA, N.D. Biologically active tetranorditerpenoids from the fungus *Sclerotinia homoeocarpa* causal agent of dollar spot in turfgrass. **Journal of Natural Products**, London, v. 72, n. 12, p. 2091-2097, 2009.
- IGARASHI, Y.; IKEDA, M.; MIYANAGA, S.; KASAI, H.; SHIZURI, Y.; MATSUURA, N. Two butenolides with PPAR α agonistic activity from a marine-derived *Streptomyces*. **The Journal of Antibiotics**, London, v. 68, n. 1, p. 345-347, 2014.
- JONSSON, A.; TORSTENSSON, N. Protease inhibitors from *Streptomyces violascens*: production of the inhibitors. **Archiv Fur Mikrobiologie**, Berlin, v. 83, n. 1, p. 71-77, 1972.

- JONSSON, C.M. **Fosfatase ácida da microalga *Selenastrum capricornutum*: extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola**. 2005. 117 p. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR., A.P. Purificação de produtos biotecnológicos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMILDELL, W. (Ed). **Biociologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 2, p. 254.
- KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S.-C.; JEON, Y. S.; LEE, J.H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary**, Reading, v. 62, n. 3, p. 716-721, 2012.
- LOTINA-HENNSEN, B.; KING-DÍAZ, B.; PEREDA-MIRANDA, R. Tricolorin A as a natural herbicide. **Molecules**, London, v. 18, n. 1, p. 778-788, 2013.
- MA, J.; LIN, F.; WANG, S.; XU, L. Acute toxicity assessment of 20 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, San Diego, v. 72, n. 6, p. 1164-1171, 2004.
- MA, J.; WANG, S.; WANG, P.; MA, L.; CHEN, X.; XU, R. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 63, n. 3, p. 456-462, 2006.
- MA, J.; XU, L.; WANG, S.; ZHENG, R. Z.; JIN, S.; HUANG, S.; HUANG, Y. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San, Diego, v. 51, n. 2, p. 128-132, 2002
- MAYER, A. Special issue on marine toxins. **Marine Drugs**, Basel, v. 7, n. 1, p. 19-23, 2009.
- MORAES, F.C. **Esponjas das ilhas oceânicas brasileiras**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011. 252 p. (Série Livros, 44).
- MUKKU, V.J.; SPEITLING, M.; LAATSCH, H.; HELMKE, E. New butenolides from two marine streptomycetes. **Journal of Natural Products**, London, v. 63, n. 11, p.1570-1572, 2000.
- PALLAS, P.S. **Elenchus zoophytorum sistens generum adumbrationes generaliores et specierum cognitarum succinctas descriptiones, cum selectis auctorum synonymis**. Hagae: Petrum van Cleef, 1766. 451 p.
- PEREDA-MIRANDA, R.; MATA, R.; ANAYA, A.L.; WICKRAMARATNE, D.B.W.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Tricolorin A, major phyto-growth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. **Journal of Natural Products**, London, v. 56, n. 1, p. 571-582, 1993.

PEREIRA, W.S.P. Herbicida de pré-emergência – Oxifluorfen. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 4, n. 12, p. 45-60, 1987.

PETERSON, H.G.; BOUTIN, C.; FREEMARK, K.E.; MARTIN, P.A. Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 39, n. 2, p. 111-134, 1997.

PIMENTEL-ELARDO, S.M.; KOZYTSKA, S.; BUGNI, T.S.; IRELAND, C.M.; MOLL, H.; HENTSCHEL, U. Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. **Marine Drugs**, London, v. 8, n. 2, p. 373-380, 2010.

PINHEIRO, U.S.; HAJDU, E. Shallowwater *Aplysina nardo* (Aplysinidae, Verongida, Demospongiae) from the São Sebastião Channel and its environs (Tropical southwestern Atlantic), with the description of a new species and a literature review of other Brazilian records of the genus. **Revista Brasileira de Zoologia**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 143-160, 2001.

SCHWARTZ, J. **Everything but-enolides**. 2014. 872 p. Thesis (PhD) - Bard College, New York, 2014.

SHIRLING, E.B., GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary**, Reading, v. 16, p. 313-340, 1966.

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

TAKADA, K.; NINOMIYA, A.; NARUSE, M.; SUN, Y.; MIYAZAKI, M.; NOGI, Y.; OKADA, S.; MATSUNAGA, S. Surugamides A–E, Cyclic octapeptides with four d-amino acid residues, from a marine *Streptomyces* sp.: LC–MS-aided inspection of partial hydrolysates for the distinction of d- and l-amino acid residues in the sequence. **Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. 78, n. 13, p. 6746-6750, 2013.

TAYLOR, M.W.; RADAX, R.; STEGER, D., WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 2, p. 295-347, 2007.

TOMIOKA, H.; KAGAWA, M.; NAKAMURA, S. Some enzymatic properties of 3 β -hydroxysteroid oxidase produced by *Streptomyces violascens*. **Journal of Biochemistry**, London, v. 79, n. 5, p. 903-915, 1976.

TRAVASSOS, P.; HAZIN, F.H.V.; ZAGAGLIA, J.R.; ADVÍNCULA, R.; SCHOBER, J. Thermohaline structure around seamounts and islands off North-Eastern Brazil. **Archives of Fisheries and Marine Research**, Praha, v.47, n. 2, p. 211-222, 1999.

TULP, M.; BOHLIN, L. Rediscovery of known natural compounds: nuisance or goldmine? **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 13, n. 17, p. 5274-5282, 2005.

VIEGELMANN, C.; MARGASSERY, L.M.; KENNEDY, J.; ZHANG, T.; O'BRIEN, C.; O'GARA, F.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomic profiling and genomic study of a marine sponge-associated *Streptomyces* sp. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, n. 6, p. 3323-3351, 2014.

VYVYAN, J.R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 1631-1646, 2002.

WIEDENMAYER, F. **Shallow water sponges of the western Bahamas**. Basel; Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1977. 287 p.

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...

...
 ...
 ...
 ...
 ...

...
 ...
 ...
 ...

...
 ...
 ...
 ...

...
 ...
 ...
 ...

6 *STREPTOMYCES ATLANTICUS* SP. NOV, UM NOVO ACTINOMICETO ISOLADO DA ESPONJA *APLYSINA FULVA*, PRODUTOR DO COMPOSTO BUTENOLIDA

Resumo

O novo actinomiceto designado como ASPSP 103^T foi isolado da esponja marinha *Aplysina fulva*, coletada no arquipélago de São Pedro e São Paulo, localizado no Oceano Atlântico Equatorial. Este *Streptomyces* produz o composto butenolida caracterizado como 4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide, com bioatividade fungicida e herbicida. As características filogenéticas, morfológicas e químicas são consistentes com o gênero *Streptomyces*. Possui células gram-positivas com cadeias de esporos curta e de forma oblonga, com predominância do ácido LL-diaminopímélico e dos açúcares galactose, maltose e xilose na parede celular. O padrão de ácidos graxos predominantes na membrana celular são anteiso-C_{15:0}; iso-C_{16:0} e C_{16:0} onde estão presentes as menaquinonas MK-9 [H₈], MK-10 [H₀], MK-9 [H₄], MK-10 [H₄] e MK-9 [H₂]. O DNA genômico é constituído de 67.6 % de G + C e possui relação filogenética com *Streptomyces violascens* ISP 5183^T (97,7%), *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T (97,15%), *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916^T (96,77%), *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455^T (96.76%), *Streptomyces daghestanicus* NRRL B-5418^T (96,56%) e *Streptomyces koyangensis* VK-A60^T (96,35%). A linhagem ASPSP 103^T é proposta como espécie tipo para uma nova espécie de *Streptomyces*, para qual o nome *Streptomyces atlanticus* sp. nov. é sugerido.

Palavra-chave: Taxonomia polifásica; Esponja marinha; Bioprospecção; Fungicida; Herbicida

Abstract

The new actinomycete designated as ASPSP 103^T was isolated from the marine sponge *Aplysina fulva*, collected on the islands of São Pedro e São Paulo, located in the Equatorial Atlantic Ocean. This *Streptomyces* produces butenolida characterized as compound 4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide with fungicide and herbicide bioactivity. The phylogenetic, morphological and chemical characteristics are consistent with the genus *Streptomyces*. It has gram-positivas cells with short and oblong chains of spores, with a predominance of LL-diaminopimelic acid and sugars galactose, maltose and xylose in the cell wall. The prevailing standard of fatty acids in cell membrane are anteiso-C_{15:0}; iso-C_{16:0} and C_{16:0} of which are present the MK-9 menaquinones [H₈] MK-10 [H₀], MK-9 [H₄], MK-10 [H₄] and MK-9 [H₂]. Genomic DNA is composed of 67.6% G + C has phylogenetic relationship with *Streptomyces violascens* ISP 5183^T (97.7%), *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T (97.15%), *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916^T (96.77%); *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455^T (96.76%), *Streptomyces daghestanicus* NRRL B-5418^T (96.56%) and *Streptomyces koyangensis* VK-A60^T (96.35%). ASPSP 103^T is proposed as type strain for a new species of *Streptomyces*, for which the name *Streptomyces atlanticus* sp. nov. is suggested.

Keyword: Polyphase taxonomy; Marine sponge; Bioprospecting; Fungicide, Herbicide

6.1 Introdução

Ambientes marinhos ocupam uma grande porção na superfície da Terra sendo também um grande reservatório de microorganismos. Dentre a grande diversidade associada a este habitat, o gênero *Streptomyces* está significamente presente (CHEN et al., 2014). Estes microorganismos são conhecidos por serem produtores de compostos bioativos das mais diversas aplicações. Pesquisas recentes reportam uma gama de novas estruturas químicas produzidas por streptomicetos marinhos comprovando a capacidade deste grupo de *Bacteria* em produzir compostos naturais bioativos (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010; ZHAO et al., 2012).

O gênero *Streptomyces* foi proposto primeiramente por Waksman e Henrici (1943) e atualmente existem 669 espécies e 38 sub-espécies descritas (LABEDA et al., 2012; EUZÉBY, 2014). Correspondem a um grande grupo de bactérias gram-positivas que contém alto conteúdo G + C (> 50%) em seu genoma, formam filamentos ramificados denominados micélio, e hifas aéreas que tipicamente se diferenciam em cadeias de esporos. A identificação de novas espécies de *Streptomyces* é realizada via uma abordagem polifásica da taxonomia, onde incluem análises de características moleculares, bioquímicas e fenotípicas (HAIN et al., 1997; ANDERSON; WELLINGTON, 2001; STACKEBRANDT et al., 2002). Atualmente a análise filogenética tem complementado a identificação por critérios estabelecidos por Shirling e Gottlieb (1968), como o uso da morfologia da cadeia de esporos, aparência da superfície dos esporos, coloração dos micélios e dos pigmentos solúveis no substrato. Concomitantemente características fisiológicas e bioquímicas, bem como quimiotaxonômicas podem adicionar informações confiáveis (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1970).

Por serem animais filtradores, as esponjas marinhas possuem uma grande variedade de associações com microorganismos, aos quais tem sido provado serem os produtores de metabólitos bioativos, que outrora acreditava-se serem produzidos pelas próprias esponjas marinhas (TAYLOR et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi descrever e reclassificar a espécie do *Streptomyces* ASPSP 103 produtor de composto com atividade fungicida e herbicida. Este microorganismo foi isolado da esponja marinha *Aplysina fulva*, no ainda pouco explorado, Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Com base na

caracterização pela taxonomia polifásica, o *Streptomyces* marinho foi determinado como pertencente a uma nova espécie do gênero *Streptomyces*, ao qual o nome *Streptomyces atlanticus* sp. nov. é proposto.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Local de amostragem

A coleta da esponja marinha no Arquipélago de São Pedro e São Paulo ocorreu em agosto 2013 de acordo com a expedição número 385 do Programa Pró-Arquipélago/CNPq/CECIRM/Marinha do Brasil.

Foram realizados mergulhos com utilização de equipamento autômato em 7 pontos ao entorno do arquipélago. Os primeiros 4 mergulhos tiveram a função de reconhecimento do local, localização de esponjas e familiarização de correntes marinhas. As amostras foram coletadas em profundidade de 20m e imediatamente armazenadas dentro de sacos plásticos esterilizados e hermeticamente fechados. Após o transporte para o laboratório de Microbiologia Ambiental – Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna/ SP, a amostra foi imediatamente processada. Partes do corpo das esponjas foram armazenadas em etanol para identificação taxonômica por especialista em Porifera do Museu Nacional (Dr. Fernando Coreixas de Moraes).

6.2.2 Isolamento Seletivo

As amostras foram inicialmente processadas por meio de trituração como estratégia para recuperar actinobactérias associados ao interior do corpo da esponja marinha (ABDELMOHSEN et al., 2010). Para isto pedaços de 1 cm³ do corpo da esponja foram trituradas e homogeneizadas com água marinha artificial. Após a trituração uma suspensão contendo 1 g do tecido da esponja e 9 mL de solução de água do mar estéril foi preparada para cada amostra e misturada em agitador de tubo por 30 minutos.

Um pré-tratamento de exposição ao ultra-som por 40 segundos (BREDHOLDT et al., 2007) foi realizado antes do plaqueamento. Diluições seriadas da ordem de 10⁻¹ a 10⁻⁵ da suspensão inicial foram feitas e plaqueadas em meio de cultivo contendo ácido húmico e vitaminas (HVA agar), pH 7,0 suplementado com

100 µg/mL de nistatina, 100 µg/mL de cicloheximida e 50 µg/mL de ácido nalidíxico (TAECHOWISAN et al., 2003) enriquecido com NaCl 3 %. Após incubação a 28 °C por 21 dias, a colônia morfologicamente semelhante a *Streptomyces* foi purificada em meio ISP3 (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). As placas de purificação foram incubadas por 1 a 4 semanas a 25 °C. O isolado purificado foi identificado como ASPSP 103 e mantido a 4 °C em placas de ISP3 e na forma de esporos ou fragmentos de micélio em glicerol 20%, armazenado a -80°C. A cepa identificada como ASPSP 103^T foi depositada na coleção de micro-organismos *ARS (NRRL) Culture Collection*, com a identificação de NRRL B-65309.

6.2.3 Identificação molecular e análises filogenética

O isolado ASPSP 103^T foi reativado em placa contendo o meio de cultivo ISP3 (*International Streptomyces Project - Medium 1-7*), (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966), para checagem da pureza da colônia e posteriormente repicado em tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo glicose-extrato de levedura (GORDON; MIHM, 1962), seguindo-se de incubação por 72 h a 28 °C e 150 rpm. A extração do DNA total das culturas foi realizada com o kit *Ultra Clean® Microbial DNA Isolation MOBio*, de acordo com especificações do fabricante. A amplificação do gene que codifica para o rRNA 16S foi realizado como descrito por Hentschel et al. (2002) utilizando os primers 27F e 1492R. O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador 3500 *Genomic Analyzer (Applied Biosystems)*. As sequências foram comparadas com sequências de linhagens tipo utilizando o servidor EzTaxon-e (KIM et al., 2012). O alinhamento das sequências foi realizado com o programa *Clustal W* (THOMPSON et al., 1994). Árvores filogenéticas foram inferidas utilizando o método de neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987), através do programa *MEGA 6 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (TAMURA, 2013). A sequência do gene que codifica para o rRNA 16S foi depositada no banco de dados *GenBank*, com o código KR911949 e comparadas a linhagens tipos como suporte a taxonomia polifásica.

6.2.4 Quimitaxonomia

A biomassa utilizada para os testes foi obtida crescendo-se o isolado em meio líquido apropriado por sete dias a 28 °C. Posteriormente, a cultura foi centrifugada (10 min por 6.000 g) e o pélete liofilizado serviu de material para as análises quimitaxonômicas. Procedimentos padrões foram aplicados para determinação dos isômeros do ácido diaminopimérico (STANECK; ROBERTS, 1974). Os açúcares presentes na parede celular foram determinados seguindo protocolo de (STANECK; ROBERTES, 1974). Menaquinonas foram extraídas e determinadas por HPLC usando o método descrito por Collins (1985). A extração dos fosfolipídios foi realizada conforme descrita por Minnikinet al. (1984) e separados por CCD bi-dimensional (MINNIKIN et al., 1984; UCHIDA et al., 1999; KROPPENSTEDT; GOODFELLOW, 2006). O perfil de ácidos graxos do isolado ASPSP 103^T foi determinado pela análise de FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*), após o crescimento da linhagem em meio de cultura apropriado, e o preparo das amostras foi seguido como proposto por Sasser (1990). Os ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa, GC (*Hewlett Packard 6890*) em com coluna de sílica gel (25m x 0,2mm) e identificado com o sistema de identificação "*Sherlock Microbial*" e ACTINO versão 5. A porcentagem do conteúdo G + C do DNA genômico foi determinado em duplicata com três replicatas (GONZALEZ; SAIZ-JIMENEZ, 2002).

6.2.5 Propriedades fenotípicas

Para a caracterização fenotípica, o isolado ASPSP 103^T foi crescido em placa contendo o meio de cultivo ISP3 (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966); seguindo-se de incubação a 28 °C e 150 rpm por duas semanas. A ornamentação e arranjo dos esporos foram observados por meio de desidratação e revestimento em ouro da colônia para viabilizar a observação e digitalização das imagens por técnica de microscopia eletrônica de varredura MEV (*Cambridge Stereoscan 240 instrument*) (O'DONNELL et al., 1993). As características de cultivo do isolado ASPSP 103^T foram determinadas por protocolos definidos pela sistemática de *Streptomicetos* (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966; KÄMPFER, 2012). Testes de tolerância a temperatura, gradiente de pH e NaCl, e sensibilidade a antibióticos foram conduzidos no meio de cultivo ISP2 (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). Testes de

degradação e assimilação de diversas fontes de carbono foram conduzidos com a utilização do meio de cultura basal GYE (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). A atividade enzimática foi determinada pelo *Kit API Zym Strips* (bioMérieux), de acordo com instruções do fabricante. A motilidade das células foi observada no meio ISP2 modificado (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966) com ágar 0.3 %, p/v e pH 7.2. A atividade de oxidase foi analisada com utilização de discos de filtro de papel impregnados com a solução de 1 % de N,N,N0,N0-tetrametil-p-fenilenodiamina (Sigma–Aldrich); com o teste positivo indicado pela formação de bolhas de coloração azul sobre os discos após serem aplicados a biomassa no disco de papel. A atividade de catalase foi testada por observação da formação de bolhas após aplicação de gotas de 3 % de H₂O₂ sobre a colônia.

6.2.6 Avaliação de bioatividade do extrato de ASPSP 103^T

O composto previamente purificado e identificado em estudo anterior como 4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide pertencente à classe das butenolidas foi utilizado em bioensaio fungicida e herbicida. O bioensaio fungicida foi conduzido durante a desreplicação do extrato bruto como método de bioensaio guiado pela atividade de inibição do *Pythium aphanidermatum*. Esta avaliação foi realizada em placas de petri com o composto aplicado em discos de papel, equidistantes de discos de *P. aphanidermatum*, inoculados no centro da placa. O bioensaio para atividade herbicida foi avaliado em *Lactuca sativa* (dicotiledônea) e *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea), ambos os organismos modelos para bioensaios de atividade fitotóxica de compostos químicos (DAYAN et al., 1999). O bioensaio foi conduzido em placas de 24 células com 4 repetições para avaliação da atividade herbicida pelo composto isolado.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Identificação taxonômica da esponja marinha

Amostras da esponja foram morfológicamente e anatomicamente caracterizadas por identificação taxonômica, realizada por comparação de descrição de espécies da literatura especializada (WIEDENMAYER, 1977; MORAES, 2011) e

por espécimes de referência da Coleção de Porífera do Museu Nacional, Rio de Janeiro Brasil. A esponja marinha foi identificada como pertencente à espécie *Aplysina fulva* (PALLAS, 1976), descrita na literatura por serem organismos produtores de lectinas com propriedades hemoaglutinantes e derivados de bromotirosina com atividade citotóxica e antimicrobiana (PINHEIRO; HAJDU, 2001).

6.3.2 Identificação molecular e análise filogenética

Foi analisada a sequência quase completa (99.5% de cobertura) do gene que codifica para o rRNA 16S do isolado ASPSP 103^T (1466 pb, GenBank KR911949). Os dados de alinhamento da sequência determinaram uma baixa similaridade com as seguintes espécies de *Streptomyces*: *Streptomyces violascens* ISP 5183^T AY999737 (97,7% - 39 nucleotídeos de diferença); *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T AB184868 (97,15% - 41 nucleotídeos de diferença); *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916^T AB184243 (96,77% - 47 nucleotídeos de diferença); *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455^T Z76676 (96,76% - 47 nucleotídeos de diferença); *Streptomyces daghestanicus* NRRL B-5418^T DQ442497 (96,56% - 50 nucleotídeos de diferença) e *Streptomyces koyangensis* VK-A60^T AY079156 (96,35% - 53 nucleotídeos de diferença).

Na árvore filogenética baseada no modelo de *Neighbour-Joining* (Figura 30), o isolado ASPSP 103^T formou uma linha filética associada a um grupo taxonômico que não são distinguíveis pela sequência do gene rRNA 16S. Pelo comprimento do ramo, ASPSP 103^T nitidamente se diferencia deste grupo que é composto por *S. violascens*, *S. hydrogenans*, *S. somaliensis*, *S. albidoflavus* e *S. daghestanicus*. Assim como *S. koyangensis* (LEE et al., 2005), ASPSP 103^T, parece ser um representante de um novo ramo filogenético dentro de gênero *Streptomyces*. Estes dados foram suportados por valores estatísticos (*bootstrap*) de 61 e 65 % recuperados pelos métodos de *Neighbour-Joining* e *Maximum Likelihood*, respectivamente (Figura 30).

Os demais espécimes que constituem a árvore filogenética possuem índice de identidade da sequência do gene que codifica para o rRNA 16S abaixo de 95 % quando contrastada a linhagem estudada. Como grupo externo para compor a raiz da árvore filogenética, foram selecionados: *Streptacidiphilus albus* DSM 41753^T AF074415 (KIM et al., 2003), espécie tipo do gênero *Streptacidiphilus*, gênero que

partilha propriedades quimiotaxonômicas e morfológicas com *Streptomyces*; e *Streptomyces albus* NRRL B-2365^T DQ026669 (WAKSMAN; HENRICI, 1943) espécie tipo do gênero *Streptomyces* (Figura 30).

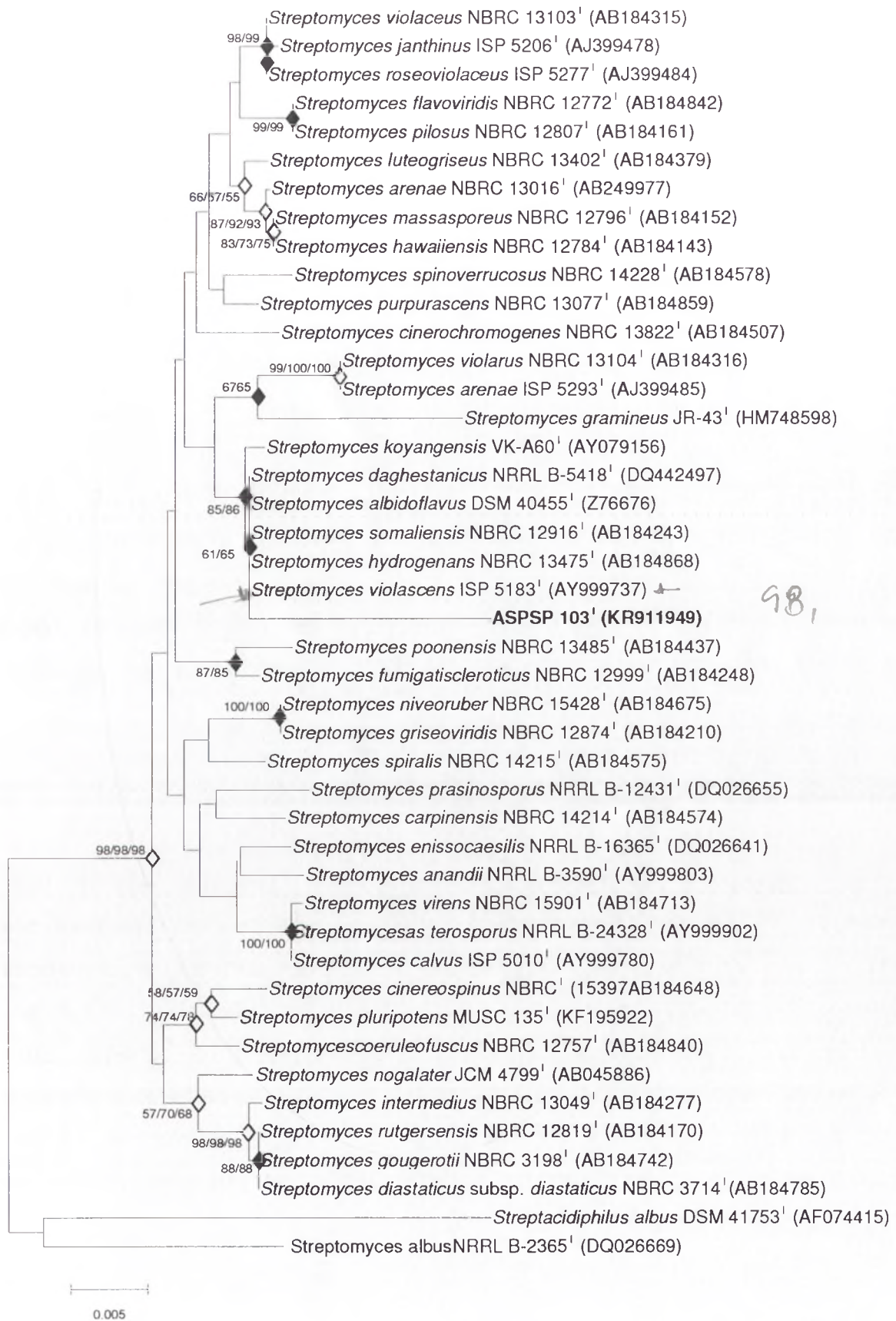


Figura 30 - Relações filogenéticas entre a linhagem ASPSP 103^T e as linhagens tipo do gênero *Streptomyces* mais próximos baseadas no método evolutivo de *Neighbour-Joining*. Losangos pretos indicam ramos da árvore recuperados no algoritmo evolutivo *MaximumLikelihood*, e losangos brancos indicam ramos da árvore recuperados nos algoritmos evolutivos de *MaximumLikelihood* e *MaximumParsimony*.

6.3.3 Quimiotaxonomia

As avaliações quimiotaxonômicas demonstraram que a linhagem ASPSP 103^T apresenta grande similaridade com o espécime *Streptomyces koyangensis* (LEE et al., 2005). A constituição do DNA genômico (% G + C) da linhagem ASPSP 103^T é $67.8 \pm 0.1\%$ idêntica ao da linhagem *Streptomyces koyangensis* VK-A60^T ($67.8 \pm 0.1\%$). A linhagem filogenética mais próxima de ASPSP 103^T, *Streptomyces violascens* ISP 5183^T possui $70 \pm 0.0\%$ G + C (Tabela 14). Tanto a linhagem ASPSP 103^T quanto *Streptomyces koyangensis* VK-A60^T possuem a parede celular com predominância do isômero ácido LL-diaminopimélico, e também uma semelhança no padrão de ácidos graxos predominantes na membrana celular composto de anteiso-C_{15:0}; iso-C_{16:0} e C_{16:0}. A análise de açúcares de parede celular revelou a predominância de galactose, maltose e xilose como predominante na linhagem ASPSP 103^T, padrão observado somente nesta linhagem. O perfil de menaquinonas caracterizou-se por conter isoprenos de 9 a 10 unidades: MK-9 [H₈] (42,1 %), MK-10 [H₀] (35,4 %), MK-9 [H₄] (12,0 %), MK-10 [H₄] (7,8 %), MK-9 [H₂] (2,7 %).

6.3.4 Propriedades fenotípicas

As observações das propriedades morfológicas do isolado ASPSP 103^T crescidos por 21 dias nos meios de cultivo ISP 1- 7 (*Internacional Streptomyces Project*), TSBA, CZAPEK e Ágar nutriente são consistentes com as características do gênero *Streptomyces* (LOCCI, 1989; WILLIAMS et al., 1989; MANFIO et al., 1995) (Figura 31). Tipicamente, as colônias crescem de forma convexa, com coloração opaca e aspecto rugoso devido à grande formação de cadeias de esporos aéreos que são distinguíveis na cobertura de toda a massa de células principalmente quando crescidos nos meios ISP3, ISP6 e Agar nutriente onde houve melhor crescimento (Figura 31).

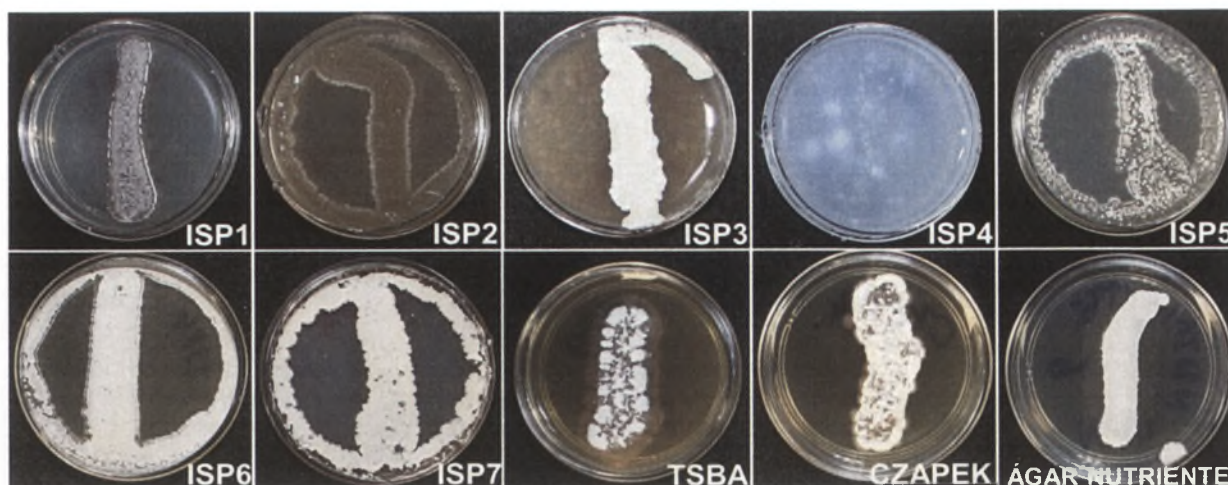


Figura 31- Variações morfológicas da linhagem ASPSP 103^T crescidas em meio *Internacional Streptomyces Project* (ISP 1- 7), TSBA, CZAPEK e Ágar Nutriente

Em meio seletivo para indução de esporulação ISP3 (farinha de aveia), a linhagem ASPSP 103^T produziu micélio de pigmentação amarelo-alaranjado quando no substrato e micélios aéreos de coloração cinza-claro (Tabela 13). Este padrão foisemelhante ao observado nas linhagens *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455^T (PRIDHAM et al., 1958) e *Streptomyces koyangensis* VK-A60^T (LEE et al., 2005), porém distintas dos demais espécimes filogeneticamente relacionados. Nas mesmas condições *Streptomyces violascens* ISP 5183^T produz micélios aéreos na coloração violeta, *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T na coloração amarelo-claro, *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916^T na coloração amarela e *Streptomyces daghestanicus* NRRL B-5418^T na coloração vermelha (Tabela 14). Nos meios ISP1 e ISP2 a linhagem ASPSP 103^T sofreu alteração morfológica na coloração da colônia e um crescimento muito fraco ou vestigial no meio ISP4 (Figura31 eTabela13). As linhagens ASPSP 103^T e *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455^T não produzem pigmentos difusíveis nos meios de cultura utilizados, diferentes dos demais espécimes correlacionados que secretam pigmentação.

Tabela13 - Crescimento e características de cultivo do isolado ASPSP 103^T em diferentes meios de cultivo após a incubação de 21 dias a 28 °C

Meio de cultura	Esporulação	Cor da colônia	
		Micélio aéreo	Micélio no substrato
ISPS1 (Extrato de levedura e malte)	Moderada	Cinza-escuro	Amarelo-alaranjado
ISPS2 (Extrato de levedura e triptona)	Moderada	Marrom	Amarelo-alaranjado
ISPS3 (Farinha de aveia)	Muito boa	Cinza-claro	Amarelo-alaranjado
ISPS4 (Sais inorgânicos e amido)	Muito Fraca	Cinza	Cinza
ISPS5 (Glicerol-asparagina)	Moderada	Cinza	Amarelo-alaranjado
ISPS6 (Extrato de levedura, peptona e ferro)	Muito boa	Cinza-claro	Amarelo-alaranjado
ISPS7 (Tirosina)	Boa	Cinza-claro	Marrom
TSBA	Moderada	Cinza-claro	Amarelo-alaranjado
Czapek	Boa	Cinza-claro	Amarelo-alaranjado
Ágar Nutriente	Muito Boa	Cinza-claro	Amarelo-alaranjado

A partir de imagens de microscopia eletrônica de varredura, pode-se observar vários estágios de desenvolvimento morfológico da linhagem (Figura 32). Após o crescimento no meio ISP3, durante 21 dias a 28 °C, o isolado ASPSP 103^T desenvolveu micélios aéreos ramificados ao longo da colônia com espessura média de 0.3 μm e cadeias de esporos relativamente curtas e retilíneas com formação de 5 a 10 esporos por segmento (Figura 32 A). Os esporos possuem forma oblonga com textura lisa e diâmetro médio de 0.9 μm (Figura 32 B). Pode ser observado um esporângio de forma esférica com diâmetro de 4.59 μm (Figura 32 A).

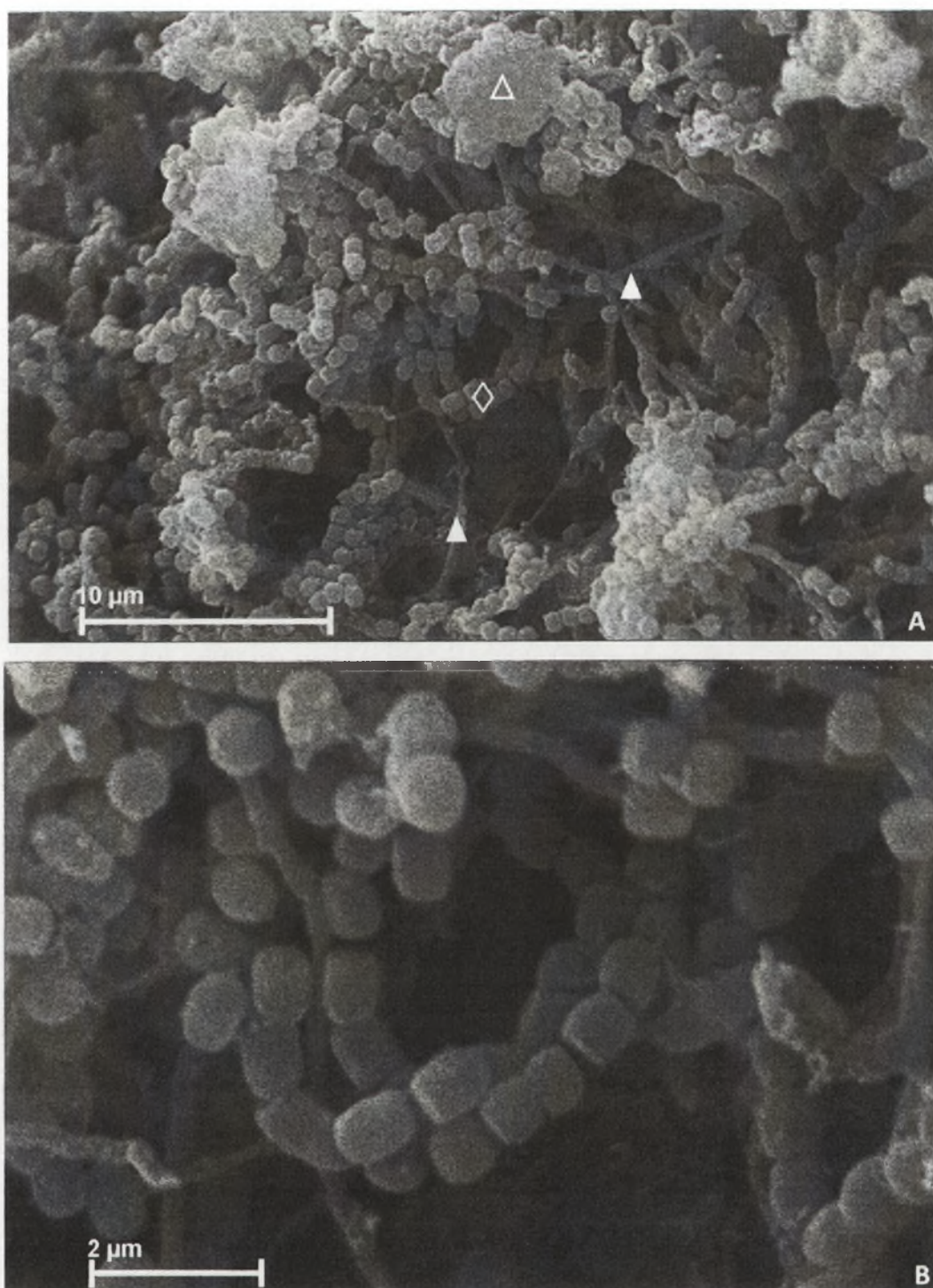


Figura 32 - Eletromicrografia de varredura da linhagem ASPSP 103^T, crescida em meio *Internacional Streptomyces Project* - ISP 3, durante 21 dias, 28 °C. A – Característica da colônia com estruturas morfológicas visíveis: Δ esporângio, \blacktriangle hifas aéreas, \diamond esporos. B – Cadeia de esporos e hifas aéreas

O padrão de crescimento de ASPSP 103^T com a utilização de fonte única de carbono é distinta dos demais espécimes co-relacionados pois o isolado estudado metaboliza L-arabinose, D-frutose, rhamnose, sacarose, D-glicose, D-xilose, raffinose, D-mannitol mas não cresce em inositol (Tabela 14).

Considerando a baixa identidade da sequência do gene que codifica para o rRNA 16S de ASPSP 103^T com *Streptomyces violascens* ISP 5183^T (97,7 %); o posicionamento na árvore filogenética e as diferenças das características quimi taxonômicas e fenotípicas com as linhagens geneticamente próximas; o isolado ASPSP 103^T foi delineado como pertencente ao gênero *Streptomyces*. Portanto, de acordo com essa caracterização polifásica, esta linhagem deve ser considerada como representante de uma nova espécie para qual o nome *Streptomyces atlanticus* sp. nov. é proposto.

Streptomyces atlanticus sp. nov. NRRL B-65309^T produz o composto caracterizado como 4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide pertencente à família das butenolidas, com bioatividade fungicida contra *Pythium aphanidermatum* e atividade herbicida pré-hermêrgência verificada em *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea), como previamente reportado.

Contudo, o presente estudo suporta a visão de que esponjas marinhas são valiosos recursos para o isolamento de novos táxons de *Streptomyces*, com potencial de exploração agrobiotecnológica.

Tabela 14 - Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas do isolado ASPSP 103^T e espécies de *Streptomyces* filogeneticamente relacionados. Linhagem/espécime: 1 - *S. atlanticus*; 2 - *S. violascens*; 3 - *S. hydrogenans*; 4 - *S. somaliensis*; 5 - *S. albidoflavus*; 6 - *S. daghestanicus*; 7 - *S. koyangensis*. Dados para referencia dos espécimes foram conferidos no trabalho de Shirling e Gottlieb (1969) e Lee et al. (2005). +, positivo; -, negativo; ND, não determinado

CARACTERÍSTICAS	1	2	3	4	5	6	7
ConteúdoG+C no DNA (mol%)	67.6	70	ND	74.1	70	ND	67.8
Coloração da massa de células aéreas em ISP 3	Cinza-claro	Violeta	Amarelo-claro	Amarelo	Cinza-Claro	Vermelho	Cinza-claro
Número da cadeia de esporos	5-10	10-50 ou mais	50 ou mais	50 ou mais	3-10	10-50	10 ou mais
Produção de melanina	-	+	-	-	-	-	+
Pigmentos solúveis:							
ISP 1	-	+	-	+	-	-	+
ISP 2	-	-	+	-	-	+	+
ISP 3	-	+	-	+	-	-	+
ISP 4	-	+	-	+	-	-	+
ISP 5	-	+	-	+	-	-	+
ISP 6	-	-	-	-	-	-	+
ISP 7	-	-	-	-	-	-	+
Crescimento em única fonte de carbono:							
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
D-Frutose	+	+	-	+	+	+	+
Ramnose	+	-	+	-	-	+	-
Sacarose	+	-	-	+	-	-	-
D-Glicose	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	-	-	-	-	-
D-manitol	+	-	-	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-

6.4 Descrição da espécie *Streptomyces atlanticus* sp. nov.

Streptomyces atlanticus (at.lan'ti.cus. L. masc. adj. *atlanticus* de ou pertencente ao habitat Oceano Atlântico, local de onde a esponja marinha *Aplysina fulva* foi coletada para o isolamento da espécie tipo estudada).

Actinomiceto aeróbico, gram-positivo, sem motilidade com cadeia de esporos contendo de 5 a 10 esporos de forma oblonga com textura lisa e diâmetro médio de 0.9 μm . Células hidrolisadas com predominância do isômero do ácido *LL*-diaminopimélico. O DNA genômico contém 67.6 % de conteúdo G + C. O perfil de ácidos graxos é composto de: *anteiso*-C_{15:0} (21.89 %), *iso*-C_{16:0} (13.80 %), C_{16:0} (12.88 %), *iso*-C_{15:0} (10.14 %), C_{16:1 ω 7 ω} C_{16:1 ω 6 ω} (9.76 %), *anteiso*-C_{17:0} (7.15 %), *iso*-C_{16:1H} (6.27 %), *iso*-C_{14:0} (5.89 %), *cyclo*-C_{17:0} (5.13 %), *anteiso*-C_{17:1 ω 9 ω} (2.69 %) e *iso*-C_{17:1 ω 9 ω} (2.17 %), *iso*-C_{17:0} (2.24 %). O perfil de menaquinonas é composto por: MK-9 [H₈] (42,1 %), MK-10 [H₀] (35,4 %), MK-9 [H₄] (12,0 %), MK-10 [H₄] (7,8 %), MK-9 [H₂] (2,7 %). Cresce bem meio de cultivo com farinha de aveia (ISP3), extrato de levedura, peptona e ferro (ISP6), tirosina (ISP7), Czapek e em ágar nutriente. Cresce moderadamente nos meios de cultivo com extrato de levedura e malte (ISP1), extrato de levedura e triptona (ISP2), glicerol e asparagina (ISP5) e TSBA. Apresenta um crescimento vestigial muito fraco no meio com sais inorgânicos e amido (ISP4). Na maioria dos meios de cultivo, a coloração da massa de esporos é cinza-claro com o lado reverso da placa em amarelo-claro. Os micélios aéreos são abundantes na maioria dos meios de cultura. Não produz melanina e também não produz pigmentos solúveis. Como única fonte de carbono utiliza adonitol, eritriol, L-arabinose, α - lactose, celubiose, dextrina, D-frutose, lactose, galactose, glicerol, glicogênio, D-glicose, maltose, sacarose, D-manitol, manose, *meso*-eritriol, *meso*-Inusitol, sorbitol, ribose, trealose, D-xilose, rafinose e L-raminose, mas não utiliza inositol. Degrada ácido tânico, ácido láctico, ácido úrico, tirosina, caseína, celulose, gelatina, guanina, amido, tween-20, tween-40, tween- 60, xantina, xilana, elastina e adenina, mas não degrada tween-80, hipoxantina, pectina, quitina, xantina, ácido nicotínico, ácido málico, ácido benzóico, ácido cítrico, ácido oxálico e ácido acético. Cresce melhor com pH 7, porém se desenvolve na faixas de pH entre 4 a 10. A melhor temperatura para o crescimento é de 28 °C, porém se desenvolve entre as temperaturas de 15 a 37 °C. Cresce em salinidade de 0 a 10 % p/v, e também em meio de cultura contendo água artificial marinha (ASW). Cresce bem na presença

dos antibióticos Eritromicina ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Ampicilina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Streptomycina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Clorofenicol ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Ácido Nalidíxo ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Penicilina ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$), porém é totalmente sensível aos antibióticos Novobiocina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Gentamicina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Rifampicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O potencial enzimático testado com API ZYM mostrou reação positiva para fosfatase alcalina, fosfatase ácida, esterase (C4), esterase lipase (C8), lucinearilamidase, cistinearilamidase, tripsina, α -quimotripsina, naftol-AS-B1-fosfohidrolase, N-acetil- β -glicosaminidase, α -glicosidase, β -glicosidase, e reação negativa para lípase (C14), α -galactosidase, β -galactosidase, β -glicosidase, α -manosidase e α -fucosidase. É positivo para atividade de urease, oxidase, catalase e peroxidase e negativo para nitrato-redutase. Produz composto da família butenolida caracterizada como 4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide, com atividade fungicida, e herbicida.

A espécie tipo ASPSP 103^T (NRRL B-65309) foi isolada da esponja marinha *Aplysina fulva*, coletada a 20 m de profundidade no arquipélago de São Pedro e São Paulo, localizado a 1,010 km ao nordeste da costa brasileira no Oceano Atlântico Equatorial ($0^{\circ}54'57''\text{N}$; $29^{\circ}20'41''\text{W}$).

Referências

ABDELMOHSEN, U.R.; PIMENTE, S.M.; HANORA, A.; RADWAN, M.; ABOU-EL-ELA, S.H.; AHMED, S.; HENTSCHEL, U. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n.3, p. 399-412, 2010.

ANDERSON, A.S.; WELLINGTON, E.M. The taxonomy of streptomyces and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 3, p. 797-814, 2001.

BOWEN, V.T. St. Paul's on the subway. **Oceanus**, Woods Hole, v. 12, n. 4, p. 2-4, 1966.

BREDHOLDT, H.; GALATENKO, O.A.; ENGELHARDT, K.; FJAERVIK, E.; TEREKHOVA, L.P.; ZOTCHEV, S.B. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, n. 11, p. 2756-2764, 2007.

CAMPOS, T.F.C.; PETTA, R.A.; THEYE, T.; SICHEL, S.E.; SIMÕES, L.S.A.; SRIVASTAVA N.K.; MOTOKI A NETO, J.V.; ANDRADE, F.G.G. Posição ímpar do Arquipélago de São Pedro e São Paulo na diversidade geológica da Terra. In: HAZIN, F.H.V.; VIANA, D.L.; SOUZA, M.A.C. **O Arquipélago de São Pedro e São Paulo: 10 anos de Estação Científica**. Brasília: Marinha do Brasil, Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar, 2009. p. 54-63.

CHEN, C.; FENG W-W.; QIN, S.; ZHAO, X-Q. *Streptomyces xiaopingdaonensis* sp. nov., a novel marine actinomycete isolated from the sediment of Xiaopingdao in Dalian, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 107, n. 2, p. 511-518, 2014.

COLLINS, M.D. **Isoprenoid quinone analyses in bacterial classification and identification**. London: Society for Applied Bacteriology, 1985. v. 2, 287 p. (Technical Series, 20).

DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, Washington, v. 26, n. 9, p. 2079-2094, 2000.

EUZÉBY, J.P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**: a folder available on the internet. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/s/streptomyces.html>> Acesso em: 24 de jul. 2015.

GONZALEZ, J.M.; SAIZ-JIMENEZ, C. A fluorimetric method for the estimation of G+C mol % content in microorganisms by thermal denaturation temperature. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 4, n.11, p. 770-773, 2002.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H.P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematic. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 119-142, 2010.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review in Microbiology**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 189-216, 1983.

GORDON, R.E.; MIHM, J.M. The type species of the genus *Nocardia*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 27, n. 1, p. 1-10, 1962.

HAIN, T.; RAINEY, N.W.; KROPPESTEDT, R.M.; STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A. Discrimination of streptomyces albidoflavus strains based on the size and the number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, n. 1, p. 202-206, 1997.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A.B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B.S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4431-4440, 2002.

KÄMPFER, P.; GLAESER, S.P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era—the polyphasic approach revisited. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 14, n. 2, p. 291-317, 2012.

KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S.-C.; JEON, Y.S.; LEE, J.H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, pt. 3, p. 716-721, 2012.

KIM, S.B.; LONSDALE, J.; SEONG, C.N.; GOODFELLOW, M. *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae (Waksman and Henrici (1943) AL) emend. Rainey et al. 1997. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.83, n.2, p. 107-116, 2003.

KROPPESTEDT, R.M.; GOODFELLOW, M. The family Thermomonosporaceae: Actinocorallia, Actinomadura, Spirillispora and Thermomonospora. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. 3rd ed. New York: Springer, 2006. v. 3. Archaea and bacteria: firmicutes, actinomycetes, p. 682-724.

LABEDA, D.P.; GOODFELLOW, M.; BROWN, R.; WARD, A.C.; LANOOT, B.; VANNCANNEY, T.M.; SWINGS, J.; KIM, S.B.; LIU, Z.; CHUN, J.; TAMURA, T.; OGUCHI, A.; KIKUCHI, T.; KIKUCHI, H.; NISHII, T.; TSUJI, K.; YAMAGUCHI, Y.; TASE, A.; TAKAHASHI, M.; SAKANE, T.; SUZUKI, K.I.; HATANO, K. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 101, n. 1, p. 73-104, 2012.

LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.P. A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TAXONOMY, 1970, Jena. **Proceedings...** Reading: 1970. p. 393-405.

LEE, J.Y.; LEE, J.Y.; JUNG, H.W.; HWANG, B.K. *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butenoic acid. **International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n.1, p. 257-262, 2005.

LOCCI, R. *Streptomyces* and related genera. **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 41, p. 2508, 1989.

MANFIO, G.P.; ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J.; ATALAN, E.; GOODFELLOW, M. Towards minimal standards for the description of streptomyces species. **Biotechnologia**, Marmur, v. 7, n. 8, p. 242-253, 1995.

MINNIKIN, D.E.; O'DONNELL, A.G.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; ATHALYE, M.; SCHAAL, A.; PARLETT, J.H. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. **The Journal of Microbiological Methods**, New York, v. 2, n. 5, p. 233-241, 1984.

MORAES, F.C. **Esponjas das ilhas oceânicas brasileiras**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011. 252 p. (Série Livros,44).

O'DONNELL, A.G.; FALCONER, C.; GOODFELLOW, M.; WARD, A.C.; WILLIAMS, E. Biosystematics and diversity amongst novel carboxydrotrophic actinomycetes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 64, n. 3, p. 325-340, 1993.

PINHEIRO, U. S.; HAJDU, E. Shallowwater *Aplysina nardo* (Aplysinidae, Verongida, Demospongiae) from the São Sebastião Channel and its environs (Tropical southwestern Atlantic), with the description of a new species and a literature review of other Brazilian records of the genus. **Revista Brasileira de Zoologia**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 143-160, 2001.

PRIDHAM, T.G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L.A.; HESSELTINE, C.W.; BENEDICT, R.G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiotics Annals**, London, v. 1956, n. 57, p. 947-953, 1957.

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

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. Newark: MIDI, 1990. 101 p. (Technical Note, 101).

SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 16, p. 313-340, 1966.

_____. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species descriptions from first study. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.18, n. 2, p. 69-189, 1968.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H.G.; VAUTERIN, L.; WARD, A.C.; WHITMANW, B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 2002.

STANECK, J.L.; ROBERTS, G.D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. **Applied Microbiology**, London, v. 28, n. 2, p. 226-231, 1974.

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

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TAYLOR, M.W.; RADAX, R.; STEGER, D., WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 2, p. 295-347, 2007.

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

TRAVASSOS, P.; HAZIN, F.H.V.; ZAGAGLIA, J.R.; ADVÍNCULA, R.; SCHOBER, J. Thermohaline structure around seamounts and islands off North-Eastern Brazil. **Archives of Fisheries and Marine Research**, Praha, v. 47, n. 2/3, p. 211-222, 1999.

WAKSMAN, S.A.; HENRICI, A.T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 337-341, 1943.

WIEDENMAYER, F. **A monograph of the shallow water sponges of the western Bahamas**. Basel; Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1977. 287 p.

WILLIAMS, S.T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 4, p. 2452-2492, 1989.

ZHAO, X.Q.; GENG, X.; CHEN, C.; CHEN, L.Y.; JIAO, W.C.; YANG, C. Draft genome sequence of the marine actinomycete *Streptomyces sulphureus* L180, isolated from marine sediment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, n. 16, p. 4482-4482, 2012.

7 CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados deste estudo proporcionaram evidências de que esponjas marinhas são uma rica fonte para a prospecção de actinobactérias associadas responsáveis pela produção de produtos naturais bioativos. A esponja *Alpysina fulva* mostrou grande potencialidade de prospecção biotecnológica voltada para a busca de actinobactérias e de compostos bioativos. Nesse sentido, destacam-se as seguintes conclusões:

- A diversidade de actinobactéria cultiváveis isoladas de *A. fulva* coletada no Arquipélago de São Pedro e São Paulo pertencem a oito gêneros dentre os quais *Streptomyces* é o gênero dominante entre os simbioses. Dados filogenéticos indicaram oito possíveis espécies novas, porém estudos mais aprofundados ainda devem ser realizados para uma nova reclassificação;

- Metabólitos secundários das actinobactérias associadas mostraram-se ativos contra os seguintes fungos fitopatogênicos: *Pythium aphanidermatum*; *Phytophthora capsici* e *Magnaporthe grisea*. As atividades antifúngicas evidenciaram o potencial das actinobactérias marinhas como uma importante fonte para o desenvolvimento de novos fungicidas para a indústria agrícola;

- Dentre as actinobactérias isoladas e analisadas para a produção de compostos bioativos, *Streptomyces* ASPSP 103 apresentou maior potencial como fonte de novos agroquímicos;

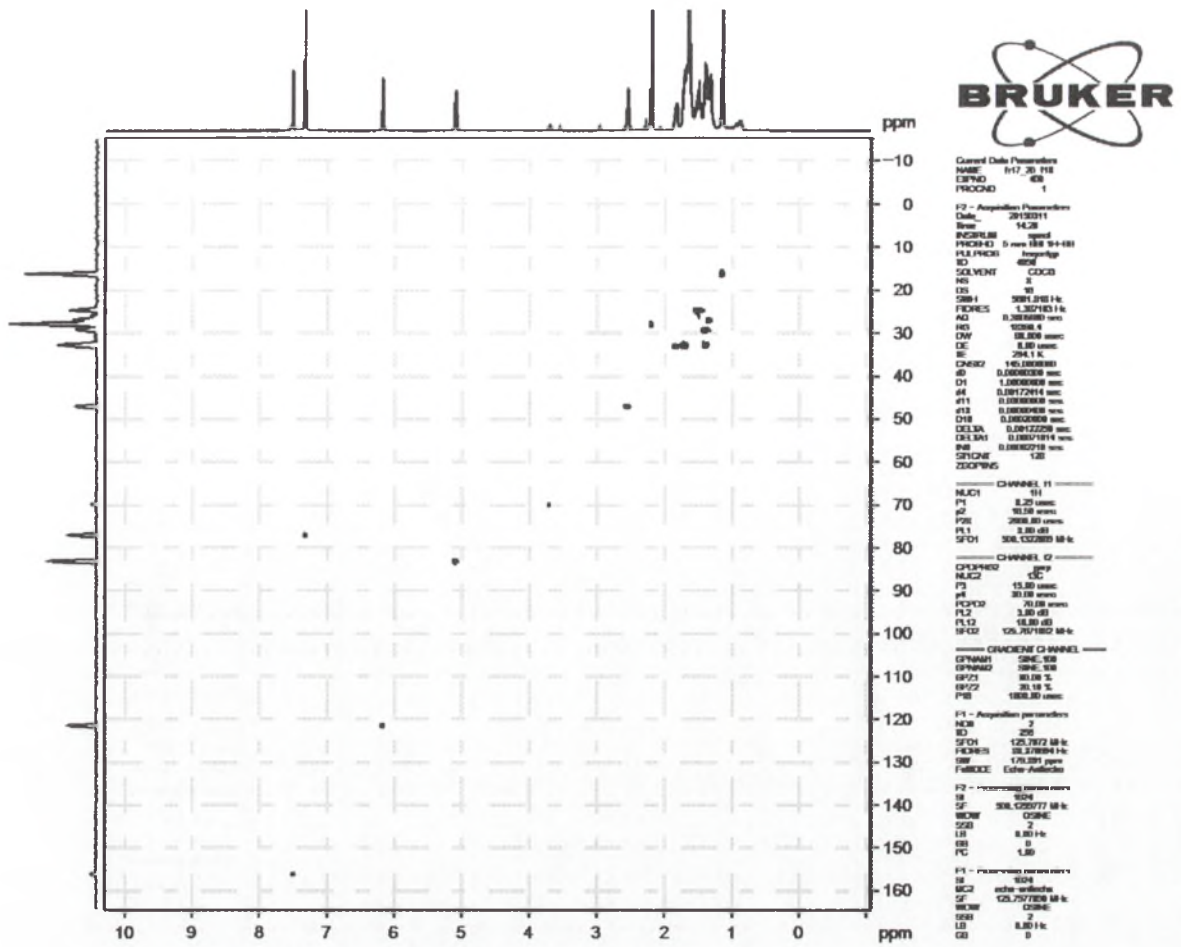
- O extrato bruto do *Streptomyces* ASPSP 103 apresenta ação algicida e forte ação herbida. O composto bioativo, assim analisado, corresponde à classe butenolida identificado como 4-hidroxi-10-metil-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide, (C₁₃H₂₀O₃), massa/carga 224,14. Este composto possui atividade herbicida de pré-emergência em modelo de monocotiledônea, o que ainda não foi relatado na literatura;

- O isolado ASPSP 103^T (KR911949), caracterizado por taxonomia polifásica, o coloca como uma nova espécie do gênero *Streptomyces*, ao qual foi proposto o nome *Streptomyces atlanticus* sp.nov, suportando a hipótese de que esponjas marinhas são valiosos recursos para o isolamento de novos táxons de *Streptomyces*;

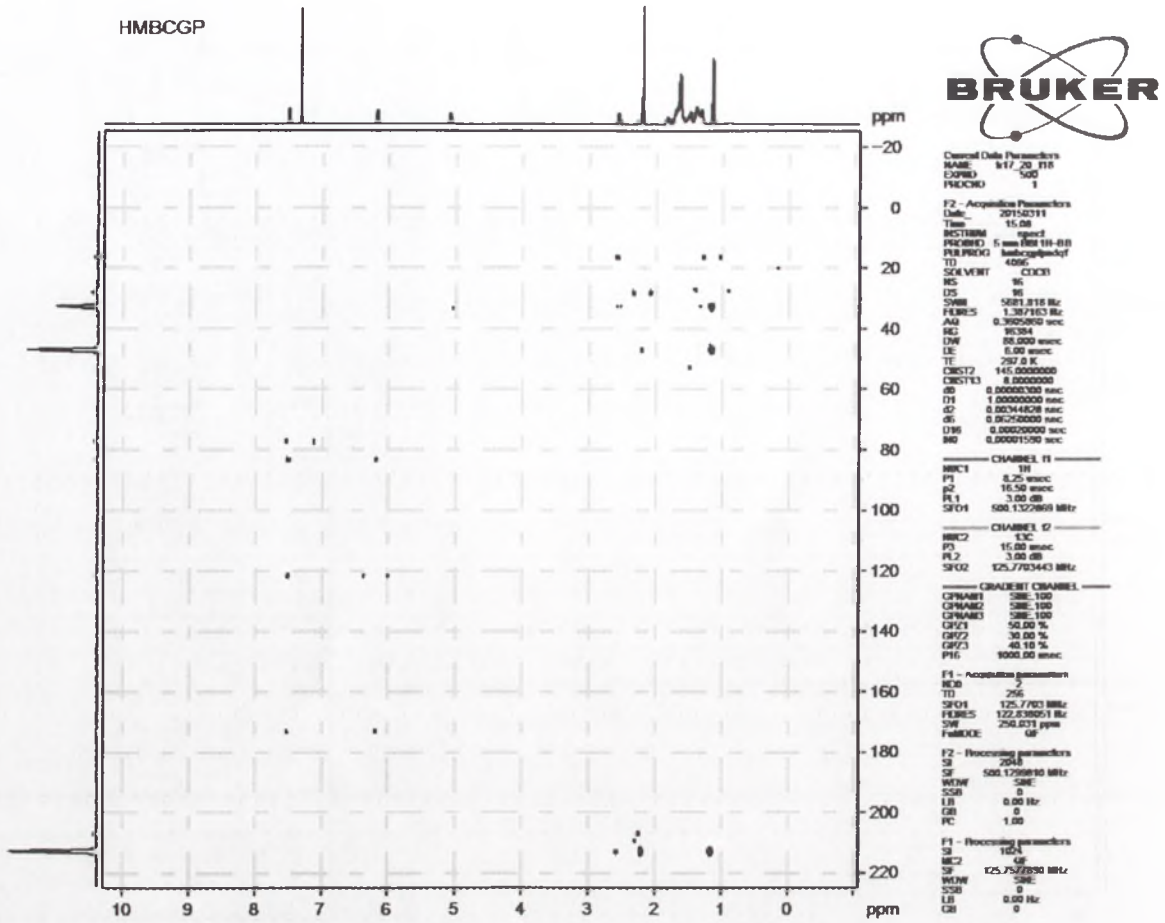
-Os resultados deste estudo destacam o potencial de actinobactérias associadas às esponjas marinhas para produzir compostos bioativos com potencial aplicação em agrobiotecnologia.

ANEXOS

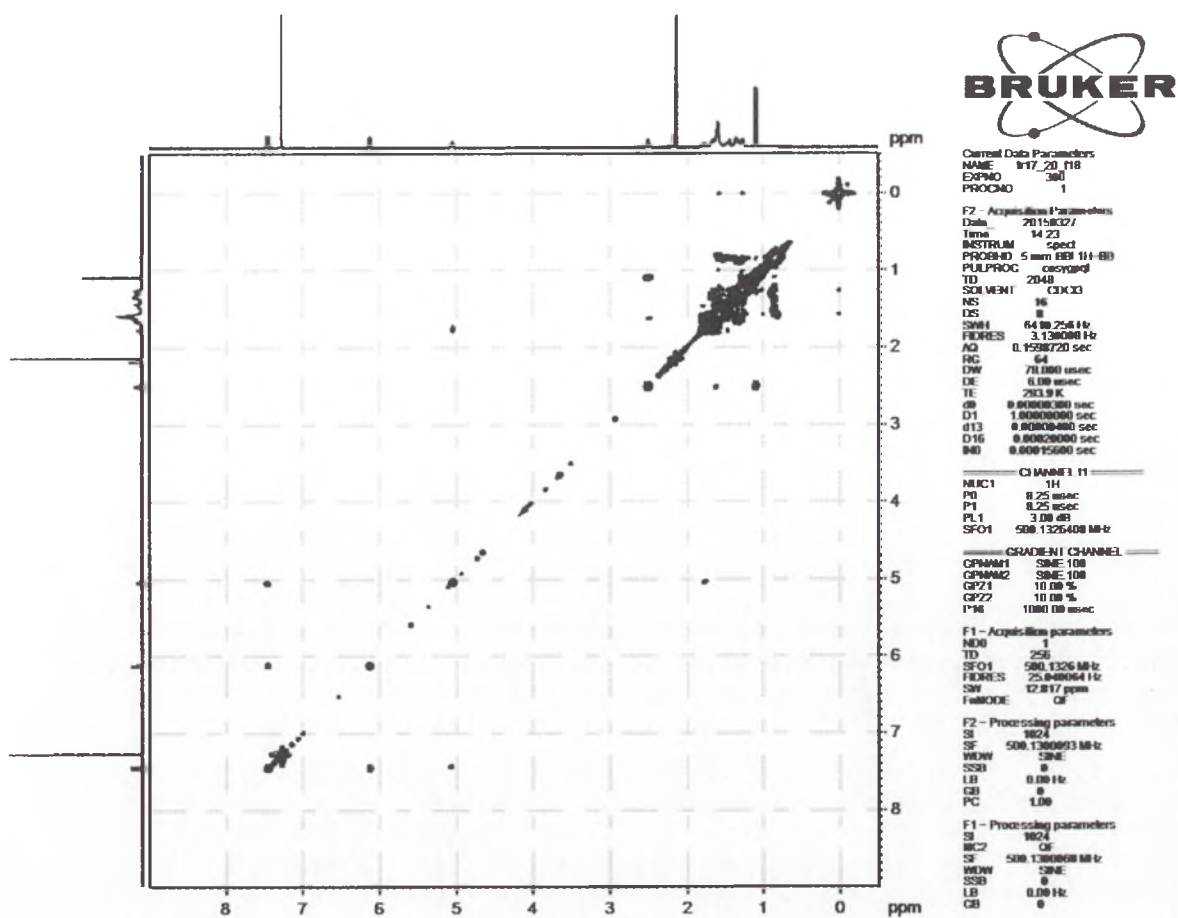
20X3WA



Anexo A - Espectro bidimensional de gHSQC da subfração ativa Fr 17-20



Anexo B - Espectro bidimensional de gHMBC da subfração ativa Fr 17-20



Anexo C - Espectro bidimensional de COSY da subfração ativa Fr 17-20

