

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

**Actinobactérias de biomas brasileiros: biodiversidade e potencial de uso na
agricultura**

Harold Alexander Vargas Hoyos

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

**Piracicaba
2018**

Harold Alexander Vargas Hoyos
Microbiologista

Actinobactérias de biomas brasileiros: biodiversidade e potencial de uso na agricultura

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

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

Piracicaba
2018

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

Vargas Hoyos, Harold Alexander

Actinobactérias de biomas brasileiros: biodiversidade e potencial de uso na agricultura / Harold Alexander Vargas Hoyos. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

130 p.

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

1. Actinobacterias 2. *Sclerotinia sclerotiorum* 3. Enzimas 4. Metabolitos secundários
5. Solubilização de fosforo 6. Diversidade Taxonômica 7. Biocontrole 8. *Streptomyces* I.
Título

Dedico

A minha família Nora e Ulises e Karen por ser a força para conseguir todo e pelo apoio infinito. A minha avó Ana Teresa, a definição de nobreza em pessoa. A minha companheira Mariana, pela companhia e carinho e a todos meus amigos que fizeram este caminho mais leve.

AGRADECIMENTOS

A mis padres, Nora y Ulises, por ser el ejemplo y motivación para conseguir mis objetivos. Los Amo;

A mi hermana Karen, por todo el amor y el cariño;

A mi abuela Ana Teresa, la persona más noble que ya conocí en la vida. Mil gracias “mita” por todas las bendiciones;

A mia tias Doris, Jenny, Sor Angela, Lili, sus familias, a todos mis primos por el apoyo en todo momento;

A mis tios David, Balmes, Eunice, Arbey, Arlex y Bladimir, a todos mis primos por el apoyo y la compañía siempre.

A minha companheira Mariana pelo amor, carinho em todo momento;

Aos meus amigos “pa’las que sea, Diego, David, Janny, Jorge, Miguel, Jairo, Felipe, Federico, Victor, Ricardo;

Ao meu orientador, Dr. Itamar Soares de Melo, muito obrigado pelo apoio, conselhos, confiança, paciência e ensinamentos;

A minha amiga e colega a Dra. Suikinai, primeira pessoa que me acolheu no Brasil, infinitas gracias!!! Muito agradecido pela ajuda em todo momento, pelas conversas, paciência;

A Dra. Carmen Fernandez Mendez, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório e as brilhantes sugestões ao meu trabalho;

Ao Dr. Fernando Andreote, pelo apoio e ajuda na adaptação a vida acadêmica no Brasil, grande admiração;

Aos pesquisadores de Embrapa Meio ambiente pelos conselhos e apoio: Dr. Rodrigo Mendes, Dra. Sonia de Queiroz, Dr. Miguel Dita, Dra. Katia de Lina Nechet;

A minha amiga Josiane Barros, pela ajuda em todo momento e as incontáveis conversas acadêmicas sempre acompanhadas de um bom café !!!

Aos colegas e grandes amigos que tive o privilégio de conhecer durante esses últimos anos de vida acadêmica: Ana Paula, Rose, Rafael Silva, Stalin, Camila, Rafael Vasconcellos, Danilo, Vanessa, Lilian, Laura, Marta, Maria Carolina, Tiago, Leonardo, Diego, Fabio e Jorge;

Ao Wallace, pelas atualizações do meu país, e como já comentei: "O laboratório precisa de mais pessoas como você"

A Juanita, por las conversaciones en español e los buenos recuerdos de la patria querida;

A Ana Gabriele, pelo apoio em todo momento e as conversas acadêmico/laborais;

A la colonia colombiana, que fueron lo más próximo a una familia todo este tiempo: Carlos, Walter, Felipe, Juan, Edgar, Jhon, Jhon Jairo, Andres, Pedro, Andrea, Juliana;

Aos técnicos dos diferentes laboratórios, obrigado pela ajuda e boa disposição João Luiz, Ana Maria, Elke, Roselly, Marcia Parma, Tatiana, Gabriel, Juliane, Marley, Debora, Marcia;

A Universidade de São Paulo especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' por todo apoio para meu crescimento profissional;

A Embrapa Meio Ambiente pelo uso do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Laboratório de Extratos Orgânicos, Laboratório de Resíduos e Contaminantes e demais para realização do meu trabalho;

A FAPESP pela bolsa de doutorado concedida no processo 2013/25076-0 que viabilizou a elaboração desta tese;

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
REFERÊNCIAS.....	17
3. DIVERSIDADE DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE TRÊS BIOMAS BRASILEIROS E SUA ATIVIDADE ANTAGÔNICA CONTRA <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT	23
3.1 INTRODUÇÃO	25
3.1. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1.1. <i>Obtenção dos isolados</i>	26
3.1.2. <i>Avaliação de antagonismo contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></i>	26
3.1.3. <i>Inibição do crescimento de micelial e da germinação de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></i>	26
3.1.4. <i>Compatibilidade com bactérias diazotróficas</i>	27
3.1.5. <i>Capacidade de solubilizar in vitro duas fontes de fósforo</i>	27
3.1.6. <i>Identificação molecular</i>	28
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.2.1. <i>Avaliação da capacidade antagonica de actinobactérias contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></i>	29
3.2.2. <i>Inibição do crescimento de micelial e da germinação de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></i>	29
3.2.3. <i>Compatibilidade com rizobactérias</i>	30
3.2.4. <i>Caracterização Molecular dos isolados de Actinobactérias</i>	31
3.3. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS.....	52
4. SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM SOJA POR ACTINOBACTÉRIA DO CERRADO	59
RESUMO.....	59
ABSTRACT	59
4.1. INTRODUÇÃO	61
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	62
4.2.1. <i>Locais de Amostragem</i>	62
4.2.2. <i>Isolamento e purificação</i>	63
4.2.3. <i>Caracterização molecular</i>	63
4.2.4. <i>Capacidade de solubilização de Fósforo e produção de ácidos orgânicos</i>	64
4.2.5. <i>Ensaio em casa de vegetação</i>	64
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.3.1. <i>Avaliação fenotípica e fisiológica do isolado 3AS4</i>	65
4.3.2. <i>Filogenia do isolado 3AS4 (<i>Streptomyces rishiriensis</i>)</i>	66
4.3.3. <i>Solubilização de fosforo</i>	67
4.3.4. <i>Quantificação do Fosforo solubilizado</i>	69
4.3.5. <i>Análise por Cromatografia líquida</i>	70
4.3.6. <i>Ensaio em casa de vegetação</i>	72
4.4. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS.....	77

5. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS EXTRACELULARES DE ACTINOBACTÉRIAS E POTENCIAL DE CONTROLE DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIUM</i>	83
RESUMO	83
ABSTRACT	84
5.1. INTRODUÇÃO	85
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	87
5.2.1. <i>Isolados de Actinobactérias</i>	87
5.2.2. <i>Avaliação de Actinobactérias com atividade enzimática quitinolítica e glucanolítica</i>	87
5.2.3. <i>Produção de metabólitos secundários de Actinobactérias</i>	87
5.2.4. <i>Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos</i>	88
5.2.5. <i>Separação dos compostos</i>	88
5.2.6. <i>Análise LC-MS das frações ativas</i>	89
5.2.7. <i>Extração de DNA e anotação do genoma do isolado IAS2a (<i>Streptomyces cavourensis</i>)</i>	89
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
5.3.1. <i>Avaliação de atividade enzimática quitinolítica e glucanolítica</i>	90
5.3.2. <i>Avaliação dos metabólitos secundários biologicamente ativos contra <i>S. sclerotiorum</i></i>	92
5.3.3. <i>Desreplicação dos extratos brutos com atividade antifúngica</i>	93
5.3.4. <i>Anotação do genoma da linhagem IAS2a (<i>Streptomyces cavourensis</i>)</i>	96
5.4. DISCUSSÃO	98
5.5. CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	102
6. <i>STREPTOMYCES RHIZOSPHAERICOLA</i> SP. NOV., UMA NOVA ACTINOBACTÉRIA QUITINOLÍTICA ISOLADA DO CULTIVO DE TRIGO DO CERRADO	107
RESUMO	107
6.1. INTRODUÇÃO	108
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	108
6.2.1. <i>Organismos e condições de crescimento</i>	108
6.2.2. <i>Caracterização Morfológica, Fenotípica e quimiotaxonômica</i>	109
6.2.3. <i>Caracterização filogenética</i>	109
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	111
6.3.1. <i>Avaliações morfológicas e fenotípicas</i>	111
6.3.2. <i>Filogenia</i>	114
6.3.3. <i>Quimiotaxonomia</i>	119
6.3.4. <i>Descrição do <i>Streptomyces rhizosphaericola</i></i>	119
6.4. CONCLUSÃO.....	120
REFERÊNCIAS	121
CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
ANEXOS	126

RESUMO

Actinobactérias de biomas brasileiros: biodiversidade e potencial de uso na agricultura

Neste estudo foi acessada a diversidade taxonômica e potencial biológico de actinobactérias isoladas de três biomas brasileiros com atividade antagônica contra *Sclerotinia sclerotiorum*. No total, 354 isolados foram obtidos da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa – Meio Ambiente. A atividade antagônica contra *S. sclerotiorum* foi avaliada por meio de ensaio *in vitro*. Foram selecionados 55 isolados, que apresentaram alguma porcentagem de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*. A identificação e análise da diversidade dos isolados, usando o gene 16S rRNA, demonstrou que 49 isolados são pertencentes ao gênero *Streptomyces*, quatro ao gênero *Micromonospora*, um a *Kocuria* e um a *Actinomadura*. Todas as actinobactérias apresentaram compatibilidade com bactérias benéficas do solo, exceto o isolado Caat P8 35. Três isolados, 1AS2a, Caat P5 55 e Caat P8 79, inibiram tanto o crescimento micelial quanto a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*. Os isolados Bc V1 06 e 3AS4 apresentaram hidrólise dos meios de fósforo orgânico e inorgânico. Com a ideia de conhecer o possível mecanismo de ação para solubilização de fósforo, o extrato aquoso do isolado 3AS4 foi submetido à análise de HPLC e o perfil cromatográfico obtido foi similar ácido glucônico. A avaliação desse isolado em casa de vegetação evidenciou diferenças na altura das plantas de soja, após seis semanas, quando inoculadas com a 3AS4. A relação Parte-aérea/Raiz foi significativamente maior quando adicionado o fósforo junto com a actinobactéria. Plantas sem adição de fósforo e com o isolado 3AS4 evidenciaram desenvolvimento similar na Parte-aérea/Raiz quando comparadas com plantas inoculadas com 40 kg ha⁻¹ de PR e SPT. A avaliação da atividade enzimática evidenciou nove isolados capazes de hidrolisar quitina e laminarina como único substrato, sendo que três deles, 1AS2a, Caat P5 55 e Caat P8 79, foram avaliados quantitativamente, para a atividade enzimática quitinase (β 1-4 -N-acetilglucosaminidase) os resultados foram 0.03, 0.22 e 0.16 UI respectivamente, e a atividade glucanase (β 1-3-glucanase) foi 0.23, 0.25 e 0.26 UI respectivamente. Extratos orgânicos das actinobactérias obtidos com diclorometano (26) e acetato de etila (15) demonstraram inibição do crescimento do fungo, somente o isolado 1AS2a apresentou inibição na concentração de 165 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estudos espectrométricos revelaram a presença de um composto da família das bafilomicinas como principal composto ativo. A anotação do genoma do isolado 1AS2a revelou a presença de 33 operons gênicos envolvidos em vias biossintéticas para produção de compostos antimicrobianos, nos quais um deles, apresentou 100% de similaridade para operon de síntese de bafilomicina. Estudos taxonômicos mostraram que as características filogenéticas, morfológicas e químicas do isolado 1AS2c são consistentes com o gênero *Streptomyces*. Entretanto, algumas diferenças no perfil taxonômico, Hibridização DNA:DNA e análise de Multilocus confirmou o isolado 1AS2c^T como linhagem tipo para uma nova espécie de *Streptomyces*, para qual o nome *Streptomyces rhizosphaericola* sp. nov. Com os resultados obtidos podemos afirmar: 1. Biomas brasileiros possuem uma grande diversidade taxonômica e funcional 2. Os isolados de Actinobactéria possuem capacidade antagonica contra o fungo *S. sclerotiorum* 3. O isolado 3AS4 possui a capacidade de solubilização de fósforo e estimulação de crescimento vegetal do em condições de casa de vegetação 4. A efetiva produção de compostos antifúngicos do isolado 1AS2a, revelados diante o uso combinando de ferramentas espectroscópicas e bioinformáticas. Considerando todo isso, existe um enorme potencial de biocontrole em isolados de Actinobactérias de diferentes biomas do Brasil que podem ser uma nova opção para uso na agricultura.

Palavras-chave: *Streptomyces*; Taxonomia; *Sclerotinia sclerotiorum*; Solubilização de fosforo; Enzimas hidrolíticas

ABSTRACT

Actinobacteria from Brazilian biomes: biodiversity and potential use in agriculture

In this study, the taxonomic diversity and biological potential of actinobacteria isolated from different Brazilian biomes with antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum* were accessed. In total, 354 isolates were obtained from the Embrapa - Environment Collection of Microorganisms of Agricultural and Environmental Importance (CMAA). The antagonistic activity against *S. sclerotiorum* was evaluated by *in vitro* assay. In total, 55 isolates were obtained, all isolates showed some percentage of visible growth inhibition against *S. sclerotiorum*. The identification and analysis of the diversity of the isolates using the 16S rRNA gene showed that 49 isolates belong to the *Streptomyces* genus, 4 isolates belonging to the genus *Micromonospora*, 1 isolated to the genus *Kocuria* and 1 isolated to the genus *Actinomadura*. All the actinobacteria showed compatibility with the soil beneficial bacteria evaluated except the isolate Caat P8 35. Three isolates, 1AS2a, Caat P555 and Caat P8 79 inhibited both mycelia and *S. sclerotiorum* sclerotia. The isolates Bc V1 06 and 3AS4 showed hydrolysis using organic and inorganic phosphorus media. In order to know the possible mechanism of action for solubilization of phosphorus, the aqueous extract of the 3AS4 isolate was submitted to HPLC analysis, the chromatographic profile obtained was similar to gluconic acid. Greenhouse evaluation showed differences in height of soybean plants after 6 weeks when inoculated with 3AS4. The Shoot/Root ratio was significantly higher when the phosphorus was added along with the actinobacteria. Plants with no phosphorus addition and with 3AS4 showed similar development in the Shoot/Root when compared to inoculated plants with 40 kg.ha⁻¹ of PR and SPT. The evaluation of the enzymatic activity evidenced nine isolates efficient of hydrolyzing chitin and laminarin as the only carbon substrate, three of them; 1AS2a, Caat P5 55 e Caat P8 79 isolates (β -1-4-N-acetylglucosaminidase) was 0.03, 0.22 and 0.16 IU respectively, however, glucanase activity (β -1-3-glucanase) was 0.23, 0.25 and 0.26 IU respectively. Organic extracts of the actinobacteria obtained with dichloromethane (26) and ethyl acetate (15) demonstrated inhibition of fungus growth, only the 1AS2a isolate presented inhibition at the concentration of 165 μ g.mL⁻¹. Spectrometric studies have revealed the presence of a compound of the bafilomycins family as the main active compound. The annotation of the genome of the 1AS2a isolate revealed the presence of 33 gene operons involved in biosynthetic pathways for the production of antimicrobial compounds, in which one of them presented 100% similarity to the bafilomycin synthesis cluster. Taxonomic studies have shown that the phylogenetic, morphological and chemical characteristics of the 1AS2c isolate are consistent with the genus *Streptomyces*. However, some differences in the taxonomic profile, DDH and Multilocus analysis confirmed the isolated 1AS2c^T as a type strain for *Streptomyces*, for which the name *Streptomyces rhizosphaericola* sp. Nov. With the results obtained we can corroborate: 1. Brazilian biomes possess a great taxonomic and functional diversity 2. Detection of the antagonism of Actinobacteria isolates against *S. sclerotiorum* fungus 3. Phosphorus solubilization and plant growth stimulation of 3AS4 isolate under conditions of greenhouse 4. The effective antifungal compounds production of the 1AS2a isolate, revealed in the combining use of spectroscopic and bioinformatics tools. Considering all this, there is an enormous potential for biocontrol in isolates of Actinobacteria from different Brazilian biomes that may be a new option for use in agriculture

Keywords: *Streptomyces*; Taxonomy; *Sclerotinia sclerotiorum*; Phosphate Solubilization; Hydrolytic Enzymes

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por fungos em cultivos de grãos são a principal preocupação dos agricultores a nível mundial. Relatos prévios descrevem perdas de até 50% da produção em países em desenvolvimento (Gohel et al., 2006). Pela necessidade de garantir o abastecimento de alimentos para a população é imperativo encontrar soluções que permitam fazer frente às doenças que afetam a produtividade de diferentes culturas.

Os biomas Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, possuem características particulares que os sugerem como reservorios de uma grande variedade de microrganismos com excepcionais capacidades biológicas. O bioma Mata Atlântica está localizado ao longo da costa litorânea desde o Rio grande do norte até o Rio grande do sul, atravessando entre outros os estados de bahias, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Neste bioma, habita quase o 70% da população do Brasil (IBF 20018). É caracterizado por um diversificado conjunto de ecossistemas florestais com estrutura e composições bastante diferenciadas, um desses ecossistemas é o Manguezal, que apresenta umas condições únicas ao albergar ao mesmo tempo regiões intertropicais oceânicas e continentais. É um ecossistema com altos níveis de matéria orgânica, salinidade e pouca disponibilidade de nutrientes como nitrogênio e fósforo, além de limitada disponibilidade de oxigênio especialmente no seus sedimentos (Kathiresan e Bingham, 2001). Estimasse que do total de biomassa microbiana, cerca de 90 % corresponde a bactérias e fungos (Zhang et al., 2005). O bioma Caatinga, é o único bioma exclusivamente do Brasil, representa quase o 11% do território nacional e, principalmente constituído por estados da região nordeste. As características climatológicas únicas da Caatinga, donde predominam as altas temperaturas durante o ano todo, acompanhado de dois períodos altamente contrastantes de chuva e seca e uma forte incidência de luz solar (Giulietti, 2006). Por tanto, estudar comunidades que conseguiram se adaptar nessas adversas condições, pode resultar em a descoberta de microrganismo com grande versatilidade metabólica e funcional (Carvalho et al., 2016). O bioma Cerrado, considerado o segundo maior bioma do país, com perto de 200 milhões de hectares, esta localizado na região centro oeste do Brasil, fazem parte dele boa parte dos estados de Mato Grosso, Goiás, Tocantins, o distrito federal de Brasília e Mato Grosso do Sul. Como características principais, o Cerrado apresenta altas temperaturas com eventuais períodos de seca e chuva. Tem sido descrito altas atividades biológicas nos solos do Cerrado, entretanto, a biodiversidade deste bioma não foi explorada consideravelmente (Silva et al., 2013). Estudos prévios relatam a presença de comunidades microbianas com alta

porcentagem de Actinobactérias (Coelho e Drozdowicz, 1978). Por tanto, resulta importante acessar a diversidade e avaliar o possível potencial biológico dos microrganismos presentes nesses biomas.

Os microrganismos que comumente habitam o solo realizam múltiplas funções que favorecem a saúde do solo e das plantas com as quais coabitam. A prevalência dessa microfauna benéfica no solo pode diminuir o uso de fertilizantes, fungicidas e pesticidas, evitando graves danos colaterais para os humanos. Além disso, podem diminuir as doenças nas plantas atuando como microrganismos antagonistas pelo uso de mecanismos de competição por espaço ou nutrientes nas proximidades da planta hospedeira (Siddikee et al., 2010). As formas de diminuir a população dos patógenos no solo podem ser realizadas por duas vias: sendo uma via direta, na qual é comum a produção de compostos líticos, antibióticos e o parasitismo das estruturas de infestação, e outra via indireta, onde atuam compostos de estimulação de crescimento e indutores de resistência na planta hospedeira (Palaniyandi et al., 2013). Dentro desse grupo de microrganismos antagonistas destacam-se as Actinobactérias.

O filo Actinobactéria, se caracteriza pela heterogeneidade funcional e potencial biotecnológico das espécies que fazem parte dele (Manimaran et al., 2015). Este filo está composto por bactérias filamentosas Gram positivas dividido em 6 classes, 25 ordens, 52 famílias e 232 gêneros, representando o maior grupo reconhecido de bactérias (Sathya 2017). Tem sido descrito que a sua presença no solo pode ser em torno de 10^5 esporos/g⁻¹.solo, em vários cultivos (Shaharokhi et al. 2005; Ul-Hassan e Wellington 2009). A ampla diversidade metabólica tem elevado a importância das Actinobactérias como um grupo predominante na microbiota do solo e, portanto, grande colaborador no seu equilíbrio biológico. Algumas linhagens de Actinobactérias têm sido descritas como protetoras contra doenças em plantas principalmente atuando no: 1) Controle direto dos fitopatógenos; 2) Fonte de compostos agroativos; 3) Produção de compostos com atividade e promoção de crescimento vegetal (Doubou et al., 2001; Abdallah et al., 2013). As Actinobactérias fazem parte de processos primordiais para o funcionamento desses ecossistemas, principalmente por meio da decomposição de matéria orgânica (Chater et al., 2010). Não menos importante é a função que elas desempenham na ciclagem de nutrientes, disponibilizando-os para serem absorvidos mais rapidamente pelas plantas (Bhatti et al., 2017).

O biocontrole de fitopatógenos por Actinobactérias pode ocorrer por diferentes mecanismos, sendo alguns deles a produção de antibióticos, o parasitismo, a competição pelo espaço físico e/ou a indução de resistência ao ataque dos patógenos (Fialho de Oliveira et al., 2010). Esses mecanismos de ação posicionam as Actinobactérias entre o grupo das Rizobactérias Promotoras do Crescimento

em Plantas (RPCPs), mais importantes da rizosfera se destacando por estimular o crescimento vegetal e diminuir a invasão de microrganismos fitopatógenos nas plantas com as quais se associam (Beneduzi et al. 2013). Dentre os mecanismos indiretos que podem exercer as Actinobactérias para o controle de microrganismos fitopatógenos, além da indução de resistência, encontra-se a solubilização de fósforo, principalmente associado à produção de ácidos orgânicos, como os ácidos cítrico, glucônico, láctico, málico e oxálico (Chen et al., 2006; Jog et al., 2014). A liberação desses ácidos já foi descrito para alguns gêneros de Actinobactéria, como é o caso de *Streptomyces* em solos com deficiência de fósforo em cultivos de trigo (Hamdali et al., 2008).

Na maioria das culturas são usados produtos químicos com íons de metais pesados (Kredics, 2003), podendo resultar na acumulação no solo e, posteriormente na absorção desses compostos pelos seres humanos. Atualmente, o incentivo à diminuição do uso de agroquímicos tem favorecido os programas de manejo integrado de diferentes doenças. No ano de 2017 o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou 405 produtos par uso agrícola, sendo que, somente o 10% destes tem origem biológico/orgânico. Ainda existe uma enorme dependência a o uso de produtos químicos na agricultura, no 2017 o Brasil importou 10,8 Bilhões de USD em produtos químicos para o agronegócio (MAPA 2018). Porém, existe a enorme necessidade de diversificar a oferta de ferramentas a ser usadas no manejo integrado de pragas e doenças. Dentre essas outras opções, existe o controle biológico, destacando-se o uso de alguns produtos baseados em formulações contendo fungos e bactérias (Zeng et al., 2012). O sucesso de um bom agente de controle biológico requer mais do que uma característica desejável, isto inclui a eficácia de controle do patógeno, sobrevivência por longos períodos no solo, em condições adversas, e capacidade de colonizar o ambiente onde interage, de modo que favoreça o desenvolvimento da planta. É de ressaltar que atualmente no Brasil não se tem produtos registrados no MAPA para uso agrícola baseados em Actinobactérias (MAPA 2018)

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das principais culturas agrícolas do Brasil (Arruda et al., 2012), com uma produção de 107 milhões de toneladas/ano, o que coloca o país como o segundo maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos com 120 milhões de toneladas/ano (CONAB, 2017). A soja pertence à família Fabaceae (leguminosa), subfamília Faboideae. Essa subfamília contém 430 gêneros e 12.600 espécies, sendo considerada a mais diversa entre as leguminosas e, também, a de maior importância econômica. Sua importância se deve principalmente ao seu alto conteúdo de proteína vegetal, cerca de 40% (Vello e Silva, 2006), sendo uma das principais matérias-primas da indústria alimentícia mundial. O mofo branco causado

pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é a principal doença do cultivo da soja (*Glycine max* (L) Merr.), (Zhang et al., 2016). Este fungo é um importante patógeno do solo, que afeta mais de 400 espécies vegetais (Bolton et al., 2006; Garcia et al., 2012). Além da soja, outras culturas agrícolas de relevância econômica/social da subfamília Faboideae como feijão (*Phaseolus vulgaris*), a alfafa (*Medicago sativa*) e o amendoim (*Arachis hypogea*) também são afetadas por este patógeno (Thaning et al., 2001). Considerando isso, foi selecionado o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* como modelo de estudo para avaliar o potencial antagônico de 55 isolados de actinobactérias provenientes dos três biomas brasileiros anteriormente descritos.

O êxito de *S. sclerotiorum* em causar danos consideráveis nas diferentes culturas que infesta, acontece principalmente, pela sua capacidade em manter estruturas viáveis de infecção (escleródios) por longos períodos. De forma geral, a prevalência do mofo branco em diferentes hospedeiros é proporcional à densidade de inóculo do patógeno no solo (Gorgen et al., 2010). Os escleródios são acúmulos multicelulares de hifas vegetativas mielinizadas fortemente agregadas, podendo chegar a medir alguns centímetros. Alguns autores relatam que a composição dos escleródios é majoritariamente, na parte externa, melanina e, na parte interna, hidratos de carbono, como β 1-3 glucanos e quitina (Jones 1970, Le tourneau, 1979). Os escleródios, além de desempenhar importante papel no mecanismo de resistência às condições adversas, em condições favoráveis, podem gerar um novo micélio para invadir outros hospedeiros. A formação dos escleródios pode ser iniciada por alguns fatores externos, como estresse oxidativo, baixo pH, danos na hifa como resposta à estresse e a disponibilidade de nutrientes (De Freitas, 2012). Tais estruturas apresentam formato e tamanhos variáveis, com tonalidades inicialmente brancas e, posteriormente negras e enrijecidas (Agrios, 1997). Os escleródios têm um papel importante no ciclo de vida de *S. sclerotiorum*. Na presença de um hospedeiro suscetível, o escleródio pode germinar por duas vias: germinação *miceliogênica* e germinação *carpogênica*. A germinação *miceliogênica* consiste na formação de um novo micélio que irá penetrar diretamente nos tecidos da base da planta ou invadir a semente (Liu e Paul, 2007). Muitas sementes colonizadas não germinam, convertendo-se num reservatório de micélio e posterior formação de mais escleródios (Tu, 1998). A germinação *carpogênica* consiste na formação dos apotécios, corpos de frutificação que emergem dos escleródios presentes na superfície do solo. Quando as condições ambientais como umidade (acima de 70%) e temperatura (amenas, abaixo de 20°C) são favoráveis estes corpos de frutificação liberam os ascósporos, responsáveis pela infecção da parte aérea (Leite, 2005). Os apotécios são a principal fonte de dispersão desse fungo e podem descarregar cerca de 20000 ascósporos maduros. Esses, em

aproximadamente dez dias, podem produzir mais de dois milhões de novos ascósporos (De Freitas, 2012). Agentes de controle biológico (ACB) reduzem com eficiência os escleródios de *S. sclerotiorum* em vários cultivos (Budge e Whipps, 1991; Huang *et al.*, 2000; Del Rio *et al.*, 2002; Chitrampalam *et al.*, 2008), como propõem Zeng *et al.*, (2012). O controle de forma direta de *S. sclerotiorum* atacando os escleródios é uma destacada alternativa de manejo.

Por tudo isso, estudos direcionados para a busca de biocompostos produzidos por Actinobactérias são promissores no controle de doenças de plantas, com relevância econômica e social. Recentes estudos têm descrito as Actinobactérias como importantes produtoras de compostos com atividade agrícola, entre eles: antiparasitários, fungicidas, larvicidas e nematicidas (Dhanasekaran *et al.*, 2010). Esses compostos, denominados metabólitos bioativos, são produtos do metabolismo primário e secundário de diferentes organismos, plantas, fungos ou bactérias (Demain e Sanches 2009).

O gênero *Streptomyces* é principal e o mais destacado grupo do filo das Actinobactérias. Atualmente identificados quase 1000 espécies que estão presentes em diferentes ambientes aquáticos e terrestres, principalmente em solos e sedimentos (Rey e Dumas 2017). Membros do gênero *Streptomyces* sp. têm exibido potencial biocontrolador contra *S. sclerotiorum* (Zucchi *et al.*, 2013). A maioria das espécies de *Streptomyces* é conhecida como: produtores de compostos antifúngicos (Gopalakrishnan *et al.*, 2011; Al-Askar *et al.*, 2014) e antibacterianos (Arasu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013); produtores de fitohormônios (Abd-Alla *et al.*, 2017) e solubilizadores de Fósforo (Shrivastava *et al.*, 2017). Entre os seus mecanismos de ação tem sido descrito: o hiperparasitismo, síntese de enzimas hidrolíticas e antibióticos (Dhanasekaran *et al.*, 2008).

Considerando todo esse panorama, é importante acessar a diversidade de Actinobactérias de três diferentes biomas brasileiros; Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, e selecionar isolados que possuam capacidade antagônica contra *Sclerotinia sclerotiorum*, assim como identificar os possíveis mecanismos envolvidos no controle deste fungo fitopatogênico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Acessar a diversidade de Actinobactérias de três ecossistemas brasileiros e avaliar seu potencial biológico visando uma aplicação agrícola contra *Sclerotinia sclerotiorum*

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar taxonomicamente isolados de Actinobactérias de diferentes biomas brasileiros.
- Selecionar isolados de Actinobactérias antagônicos a *Sclerotinia sclerotiorum*
- Avaliar a capacidade de solubilização de fósforo e promoção de crescimento vegetal da linhagem 3AS4 (*Streptomyces rishiriensis*).
- Identificar e quantificar a produção de enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários pela linhagem 1AS2a (*Streptomyces cavourensis*)

REFERÊNCIAS

- Abd-Alla MH, El-Sayed ESA, Rasmey AHM. (2017) Indole-3-Acetic acid Production of *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizosferic soil of Egypt. **Journal of Biological and Earthe Sciences**. 3:2; 183 – 193.
- Abdallah ME, Haroun SA, Gomah AA, El-Naggar NE, Badr HH (2013) Application of actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot diseases. **Arch. Phytopathol. Plant Prot.** 46 :15; 1797–1808.
- Agrios G, Plant Pathology. 4. ed. San Diego: **Academic Press**, 1997. 635 p.
- Al-Askar AA, Abdulkhair WM, Rashad YM, Hafez EE, Ghoneem KM, Baka ZA, (2014) *Streptomyces griseorubens* E44G: a potent antagonist isolated from soil in Saudi Arabia. **J. Pure Appl. Microbiol.** 8: 221–230 (Spl. Edn. 2).
- Arasu MV, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, (2013) Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect. **Chemosphere** 90; 2:479–487.
- Bhatti AA, Haq S, Bhat RA. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. **Microbial pathogenesis**. 111:457 – 468.
- Arruda RS, Mesquini RM, Schwan-estrada KRF, Nascimento JF, (2012). Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 2, p. 164-172.
- Beneduzi A, Moreira F, Costa PB, Vargas LK, Lisboa BB, Favreto R, Baldani JI, Passaglia LM, (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology** 6, 94–104.
- Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD, (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, 7; 1-16.

- Budge SP, Whipps JM, (1991). Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for the biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. **Plant Pathology**. 40:59 - 66.
- Carvalho RMM, Silva MR, Carvalho FCT, Rebouças RH, Sousa OV. (2016). Bactérias solubilizadoras de fosfato em solo rizosférico da Caatinga. **Revista Geonorte**, Edição Especial 5; 7, N.26, 48- 60.
- Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T, Schrepf H. (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **FEMS Microbiol Rev** 34:171–198.
- Chen J, Xue QH, McErlean CSP, Zhi JH, Ma YQ, Jia XT, Zhang M, Ye XX. 2016. Biocontrol potential of the antagonistic *Streptomyces enissocaesilis* against *Orobancha cumuna*. **Biocontrol**. doi:10.1007/s10526-016-9738-z.
- Chitrapalam P, Figuili PJ, Matheron ME, Subbarao KV, Pryor BM, (2008). Biocontrol of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* in desert agroecosystems. **Plant Disease**. 92: 1625–1634.
- Coelho RRR, Drozdowicz A. (1978). “The occurrence of actinomycetes in a Cerrado soil in Brazil,” **Revue d’Ecologie et de Biologie du Sol**. 15, 459–473.
- Companhia Nacional de Abastecimento (2017). Acompanhamento da safra brasileira, grãos. Safra 2017/2018, Segundo levantamento, Novembro 2017.
- Demain AL, Sanchez S, (2009), Microbial drug discovery: 80 years of progress. **J. Antibiot**. 62; 5 – 16.
- De Freitas TH. 2012. Qualidade de sementes de soja e incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary em função do beneficiamento e armazenamento. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás. 185 p.
- Del Rio LE, Martinson CA, Yang XB. (2002). Biological control of *Sclerotinia* stem rot of soybean with *Sporidesmium sclerotivorum*. **Plant Disease** 86, 999–1004
- Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam A (2008), An antifungal compound: 4’ phenyl-1-naphthyl-phenyl acetamide from *Streptomyces* sp. DPTB16. **Med. Biol**. 15; 1:7–12.

- Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam A, (2010) Herbicidal agents from actinomycetes against selected crop plants and weeds. **Natural Product Research**. 24:6:521-529.
- Doumbou CL, Salove MKH, Crawford DL, Beaulieu C. (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection** 82; 3:85–102.
- Fialho de Oliveira M, da Silva MG, Van Der Sand ST, (2010) Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. **Research in Microbiology**. 161; 565 - 572.
- Garcia RA, Juliatti FC, Cassemiro TA, (2012). Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotium* (LIB.) de Bary em meio de cultura. **Bioscience. Jornal**. 28:1; 1-7.
- Giulietti AN. (2006). Diversidade e caracterização das fanerógamas do Semi-Árido Brasileiro. **Associação Plantas do Nordeste**. 1.488 p.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS (2006) Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **Afr. J. Biotechnol**. 5;2: 54–72.
- Gopalakrishnan S, Kiran BK, Humayun P, Vidya MS, Deepthi K, Rupela OP. (2011) Biocontrol of charcoal-rot of sorghum by actinomycetes isolated from herbal vermicompost. **Afr. J. Biotechnol**. 10: 79;18142–18152.
- Görgen CA, Civardi EA, Ragagnin VA, da Silveira Neto AN, Carneiro LC, Junior ML, (2010). Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. **Pesq. agropec. bras**. 45:10; 1102-1108.
- Hamdali H, Boizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, Virolle MJ, Ouhdouch Y, (2008) Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied soil ecology**. 38. 12 – 19.
- Huang HC, Bremer E, Hynes RK, Erickson RS. (2000). Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**. 18, 270–276.

- Instituto Brasileiro de Florestas. (2018). <https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>. Visitado em Fevereiro de 2018.
- Jog R, Pandya M, Nareshkumar G, Rajkumar S, (2014), Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. Isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. **Microbiology**. 160; 778–788
- Jones D. 1970. Ultrastructure and composition of the cell walls of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Transact. Brit. Mycol. Soc.** 54: 351–360.
- Kathiresan K, Bingham BL. (2001). Biology of Mangroves and mangrove ecosystems advances. **Marine Biology**. 40, 81 – 251.
- Leite RM, (2005). Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: **Embrapa Soja**, 3 p
- Le Tourneau D. (1979). Morphology Cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**. 69: 887–890.
- Liu Y, Paul VH, (2007). Studies on the germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 114; 7 - 9.
- Kredicks L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei F, Nagy E, (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potencial. **Food Technology Biotechnology**, 41: 37-42
- Manimaran M, Gopal JV, Kannabiran K, (2015), Antibacterial activity os *Streptomyces* sp. VITMK1 isolated from Mangrove Soil of Pichavaram, Tamil Nadu, India. **Proc. Natl. Acad. Sci. India Section B: Biological Sciences**. 87 10.1007/s40011-015-0619-5.
- Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2018). http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Visitada em fevereiro de 2018.
- Palaniyandi A, Yang S, Zhang S, Suh Won. (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. **Applied microbiology and biotechnology**. 97; 9621-9636.

- Rey T, Dumas B (2017) Plenty Is No Plague: *Streptomyces* Symbiosis with Crops. **Trends in Plant Science**. 22:1; 30-37.
- Sathya A, Vijayabharathi R, Gopalakrishnan S, (2017) Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. **3 Biotech**. 7:102.
- Shaharokhi S, Bonjar S, Saadoun GHI, (2005) Biological control of potato isolates of *Rhizoctonia solani* by *Streptomyces olivaceus* strain 115. **Biotechnology** 4:132–138
- Shrivastava P, Kumar R, Yandigeri MS, (2017) In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 24; 192–199.
- Siddikee MA, Chauhan PS, Anandham R, Han GH, Sa T, (2010) Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. **J Microbiol Biotechnol** 20;11:1577–1584.
- Silva MS, Sales AN, Magalhães-Guedes KT, Dias DR, Schwan RF. (2013). Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. **BioMed research international**, 2013:1-10.
- Thaning C, Welch CJ, Borowicks JJ, Hedman R, Gerhardson B (2001) Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* apothecial formation by the soil bacterium *Serratia plymuthica*: identification of a chlorinated macrolide as one of the causal agents. **Soil Biol. Bioch.** 33:1817 – 1826.
- Tu C, (1998). The role of mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary. **Journal of Phytopathology**. 121:1; 40-50
- Ul-Hassan A, Wellington EM, (2009) Actinobacteria. In: Schaechter M (ed) **Encyclopedia of microbiology**. Academic Press, New York, pp 26–44.
- Vello NA, Silva LAS, (2006). Genética busca atender ao consumo humano crescente. **Visão agrícola**, 3:5; 60-62.

- Taechowisan T, Lu C, Shen Y, Lumyong S (2005) Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology**, 151; 5:1691–1695.
- Zeng W, Kirk W, Hao J, (2012). Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. **Biological Control**, 60. 141–147.
- Zhang QR, Chu WH, Chen FS, Li S. (2005). Insect biochemistry. **Molecular and Biology**. 35, 153 – 164.
- Zhang W, Wei S, Zhang J, Wu W (2013) Antibacterial activity composition of the fermentation broth of *Streptomyces djakartensis* NW35. **Molecules**, 18; 3:2763–2768.
- Zhang F, Ge H, Zhang F, Guo N, Wang Y, Chen L, Ji X, Li C, (2016) Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, 100, 64-74
- Zucchi TD, Almeida LG, Moraes LAB, Consoli FL, (2013), Albocycline, the main bioactive compound from *Propionicimonas* sp.ENT-18 against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Industrial Crops and Products**, 5:2; 264 – 268.

3. DIVERSIDADE DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE TRÊS BIOMAS BRASILEIROS E SUA ATIVIDADE ANTAGÔNICA CONTRA *SCLEROTINIA SCLEROTIURUM*

Resumo

Neste estudo foi acessada a diversidade taxonômica e potencial biológico de Actinobactérias isoladas de três biomas brasileiros; Cerrado, Caatinga e Mata atlantica com atividade antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum*. No total 354 isolados foram acessados da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa – Meio Ambiente. Foi feita a avaliação da capacidade antagonista *in vitro* usando o antagonismo direto. Do total, 55 isolados apresentaram atividade antifúngica, 18 isolados apresentaram inibição entre 0 e 35%, 35 apresentaram inibição entre 36 e 70% e dois apresentaram inibição acima de 70%. A identificação e análise da diversidade dos isolados com atividade antagonista foi realizada através da análise por sequenciamento do gene 16S rRNA, essa análise demonstrou que 89% dos isolados (49) são pertencem ao gênero *Streptomyces*, quatro isolados pertencem ao gênero *Micromonospora*, um isolado ao gênero *Kocuria* e um isolado ao gênero *Actinomadura*. O potencial biológico dos 55 isolados foi determinado com o uso de avaliações como: compatibilidade com bactérias benéficas do solo, capacidade de solubilizar fósforo *in vitro* usando diferentes fontes de fosfato e a capacidade de inibir a germinação de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando discos de micélio e escleródios. Todas as Actinobactérias apresentaram compatibilidade com as bactérias benéficas do solo, menos o isolado Caat P8 35. Entre os isolados avaliados, oito solubilizaram pelo menos uma das duas fontes de fósforo, os isolados Bc V1 06 e 3AS4 apresentaram hidrólise em ambos meios. 22 isolados apresentaram inibição do crescimento micelial ou escleródios de *S. sclerotiorum* sendo que, 3 isolados (1AS2a, Caat P5 55 e Caat P8 79) apresentaram inibição de ambos. Considerando esses resultados, o acesso a diversidade destes biomas brasileiros pode ser uma fonte importante de microrganismos com potencial biológico, por tal motivo, é interessante conhecer a diversidade genética, assim como as características destacadas de este tipo de microrganismos visando seu uso no setor agrícola.

Palavras-chave: Antagonismo, Solubilização de Fósforo, Bactérias Diazotróficas, *Streptomyces*

Abstract

In this study, taxonomic diversity and biological potential of actinobacteria isolated from different Brazilian biomes with antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum* were investigated. In total, 354 isolates were accessed from collection of microorganisms of agricultural and environmental importance (CMAA) Embrapa - Environment. The *in vitro* antagonistic activity was evaluated in dual culture. A total of 55 isolates with antifungal activity were detected, 32.4% of the isolates showed inhibition between 0 and 35%, however, 64% of the isolates showed inhibition between 36 and 70%, and two isolates (3.6%) showed inhibition above 70%. The identification and study of the diversity of isolates with antagonistic activity was made through the sequencing analysis of the 16S rRNA gene. This analysis shows that 89% of the isolates (49) belong to the genus *Streptomyces*, 4 isolates belonging to the genus *Micromonospora*, 1 isolated belongs to the genus *Kocuria* and 1 isolated belongs to the genus *Actinomadura*. The biological potential of the isolates was determined with the use of evaluations such as; compatibility with soil beneficial

bacteria, ability to solubilize phosphorus in vitro different sources of phosphate and the ability to inhibit the germination of *Sclerotinia sclerotiorum* using mycelia discs and sclerotia. All the actinobacteria were compatible with the beneficial bacteria of the soil, except the Caat P8 35 isolate. Eight isolates solubilized either of the two phosphorus sources, however, the isolates Bc V1 06 and 3AS4 showed hydrolysis in both media. 22 isolates presented *S. sclerotiorum* in vivo biocontrol potential, 3 of them (1AS2a, Caat P5 55 and Caat P8 79) inhibited both mycelia and sclerotia growth of *S. sclerotiorum*. Considering these results, the diversity of Brazilian biomass is an important source for the identification and evaluation of microorganisms with biological potential. For this reason, it is interesting to know the genetic diversity as well as the potential characteristics that this microorganisms present for their possible use in the agricultural sector.

Keywords: Antagonism, Phosphorus Solubilization, Diazotrophic Bacteria, *Streptomyces*

3.1 Introdução

O solo é o principal fator para a sustentabilidade agrícola, todos os processos ecológicos que ali se desenvolvem afetam de maneira direta ou indireta a produtividade. Os Microrganismos, como parte fundamental do solo, podem influenciar vários dos ciclos geoquímicos que ali se desenvolvem, principalmente o ciclo do carbono, nitrogênio e fósforo. Além disso, os Microrganismos podem suprimir ou reduzir o potencial de inóculo de diferentes fitopatógenos nos cultivos, fato que somado ao efeito estimulador de crescimento em plantas, favorecem o desenvolvimento das plantas.

Actinobactéria é o principal filo bacteriano presente no solo (Cuesta et al., 2012), sua diversidade funcional e genética, as constituem em uma importante opção biológica para uso agrícola. Esse grupo de Microrganismos é conhecido como destacadas micro "fábricas" de compostos ativos (Solecka et al., 2012) e constituem o maior grupo de habitantes saprofitos distribuídos no solo (Takizawa et al., 1993). A rizosfera de plantas é um dos melhores habitats para as actinobactérias, onde destaca-se o gênero *Streptomyces*, bactérias aeróbicas gram positivas produtoras de micelio aéreo (Anderson e Wellington 2001). Este gênero é conhecido colonizador da rizosfera (Miller et al. 1990) e agente de biocontrole de fungos patogênicos de solo (Aghighi et al., 2004), destacado produtor de enzimas líticas e compostos estimuladores de crescimento vegetal (Ilic et al., 2007)

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary é o agente causal da doença do Mofó Branco que ataca mais de 400 espécies vegetais (Fernando et al., 2007, Gaourgouri et al., 2017). A doença é a principal causa de perdas de rendimento de soja, nas principais regiões produtoras do mundo, devido a falta de variedades resistentes e à sobrevivência do patógeno no solo por meio de estruturas recalcitrantes como os escleródios. A germinação do escleródio no solo é um evento chave no início da doença devido : 1). Podem germinar e produzir novo micelio que irá invadir diretamente a planta 2). Ser o precursor de outra estrutura infectiva, o apotécio, que pode disseminar os ascósporos via aérea, infestando principalmente as plantas de soja logo após da floração (Geraldine et al, 2013).

Conhecer a diversidade taxonômica e funcional das actinobactérias com capacidade antagônica contra *S. sclerotiorum*, permitirá descobrir linhagens com possibilidade de serem testadas posteriormente em condições de campo visando a formulação de um novo produto biológico.

3.1. Material e Métodos

3.1.1. Obtenção dos isolados

Os isolados de actinobactérias utilizados neste trabalho foram previamente isolados de solos de três biomas brasileiros: Mata atlântica (Manguezal), Cerrado e Caatinga. Todos os isolados obtidos foram depositados na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA), localizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental (Embrapa Meio Ambiente). (Anexo 1) Todos os isolados foram reativados em meio ISP2 (Extrato de levedura e malte) e/ou GY (Glicose e levedura) e incubados a 28°C por 72 - 90 h antes do início dos experimentos.

3.1.2. Avaliação de antagonismo contra *Sclerotinia sclerotiorum*

As 354 actinobactérias foram transferidas para placas de Petri contendo meio ISP2 (Extrato de levedura 4 g/L, Extrato malte 10 g/L, glicose 4g/L, ágar, 20g/L pH a 7,3.) a três centímetros de distância do centro da placa Petri e incubados por três dias a 28 °C. Posteriormente, um disco (0.5 cm de diâmetro) de micélio da linhagem fitopatogênica *S. Sclerotiorum* (CMAA 1149) foi depositado no centro da placa de Petri e incubado a 22°C por sete dias. Placas encubadas somente com o fungo e sem a presença de Actinobactéria foram usadas como controles.

Foi medido o crescimento do patógeno em milímetros, e a porcentagem de inibição determinada de acordo com a fórmula: $PI = (C - T) / C \times 100$, onde; C é o crescimento da colônia de *S. sclerotiorum* na ausência da Actinobactéria, T é o crescimento da colônia de *S. sclerotiorum* em presença da Actinobactéria (Shrivastava et al., 2017). A porcentagem de inibição foi considerada como baixa (% inibição entre 0 e 35%), moderada (% entre 36 e 70%) e alta (% inibição maior o igual a 70%).

3.1.3. Inibição do crescimento de micelial e da germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

Para a avaliação da inibição da germinação de *S. sclerotiorum*, foram utilizadas dois propágulos do fungo fitopatogênico; escleródios e discos de micélio ativo. Inicialmente, foi preparada uma suspensão com cada uma das 55 actinobactérias, previamente inoculadas em meio ISP-2 e

incubadas durante duas semanas a 28°C, posteriormente a suspensão de esporos (1×10^8) foi feita usando uma solução de Tween 80 (0.5%). Para à avaliação dos *discos de micélio* ativo (100% germinação previamente confirmada) 10 discos de micélio de *S. sclerotiorum* foram imersos em cada suspensão de esporos das actinobactérias por uma hora a 28°C, posteriormente, foram transferidos para placas de Petri contendo Agar Agua (AA). Para à avaliação dos *escleródios* ativos (100% germinação previamente confirmada), 10 escleródios do *S. sclerotiorum* foram imersos em cada suspensão de esporos das actinobactérias por uma hora a 28°C, posteriormente, foram transferidos para folhas de plantas de soja. A avaliação de inibição de crescimento e germinação foi feita até o dia em que germinou o 100% dos controles (agua destilada estéril), a determinação da porcentagem de inibição por parte das actinobactérias foi calculada a partir da diferença na germinação dos tratamentos e os controles.

3.1.4. Compatibilidade com bactérias diazotróficas

As 55 actinobactérias foram avaliadas com o fim de conhecer a sua capacidade de crescer conjuntamente com bactérias benéficas da soja; *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum* sp. Para isto, cada actinobactéria foi inoculada fazendo uma estria em um dos polos da placa de Petri e incubado durante 3 dias e 28°C, a fim de favorecer seu máximo crescimento e adequada produção de compostos ativos, uma suspensão de cada bactéria (concentração de 1×10^8 UFC/mL) diazotrófica, foi inoculada em sentido perpendicular da estria da Actinobactéria, posteriormente incubada por 48h e 28°C até apresentarem abundante crescimento. A capacidade de crescimento conjunto (Compatibilidade) das Actinobactérias com cada uma das bactérias foi avaliado como (+++): Abundante, (++) : Moderado e (+): Baixo.

3.1.5. Capacidade de solubilizar *in vitro* duas fontes de fósforo

A fim de avaliar o potencial dos 55 isolados de actinobactérias em solubilizar fósforo, foi determinado o halo de hidrólise em dois meios contendo fosfato orgânico e inorgânico como única fonte de fósforo. Para o caso do fósforo orgânico, os 55 isolados foram avaliados inoculados no meio PSM (Phytate Specific Media), contendo: glucose 1,5%; sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)

0,5%; cloreto de sódio (NaCl 0,01%); cloreto de potássio (KCl) 0,05%; sulfato de ferro II (FeSO₄) 0,001%; sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) 0,01%; cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O) 0,01%; sulfato de manganês (MnSO₄) 0,001%; fitato de cálcio (C₆H₁₈O₂₄P₆) 0,5% e ágar 1,5% em 1000 ml de água destilada (Singh et al., 2013). Para o caso de fósforo inorgânico, foi utilizado o meio NBRIP contendo: 1% de glicose; 0,5% de cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl₂.6H₂O); 0,025% de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O); 0,02% de cloreto de potássio (KCl); 0,01% de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄); 0,5% de fosfato de cálcio (Ca₃(PO₄)) e 1,5% de Ágar em 1000 ml de água destilada (Nautiyal, 1999).

3.1.6. Identificação molecular

Os 55 isolados de actinobactéria foram reativados em caldo glicose-extrato de levedura (GY) incubados por 72 h a 28°C e 150 rpm. A biomassa resultante foi utilizada na extração de DNA total, utilizando o kit *Ultra Clean® Microbial DNA Isolation* (12224-250 MO Bio, USA), de acordo com especificações do fabricante. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizado utilizando os iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') e 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). Cada reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando 1 µL de DNA genômico, 2,5 µL de tampão de PCR 10x, 1 µL de solução de MgCl₂ (50mM), 0,65 µL DE dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada iniciador (10 mM), 0,3 µL de Taq polimerase (5 U/ µL) e 17,7 µL de água Milli-Q estéril. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *AB Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycle* com a seguinte programação desnaturação inicial 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C e finalmente 10 minutos a 72°C . A purificação dos produtos de PCR foi feita utilizando o kit de purificação *Promega Wizard SV gel and PCR clean-up system* – Ref A9282. A PCR de sequenciamento do fragmento de interesse foi feita usando o kit de sequenciamento BigDye, usando as condições: 2 µL de tampão ABI 5x, 1 µL de cada iniciador 27F, 704F (5'-AGA TTT TCC GAC GGC AGG TT-3'), 1114R (5'-GGG TTG CGC TCG TTG C-3') e 1492R (5 mM), 1 µL de Big Dye, 1 µL de DNA (40 ng) o volume restante foi completado adicionando de água Milli-Q estéril. A reação foi feita em termociclador *AB Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycle*, programado assim: desnaturação inicial 1 min a 96°C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 55°C, 4 minutos a 60°C. O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador 3500 Sanger

Genomic Analyzer (Applied biosystems, Foster City, Calif.). As sequências foram comparadas com sequências de linhagens tipo utilizando o servidor EzTaxón-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 e Nei, 1987), através do programa *MEGA 7 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Tamura, 2013)

3.2. Resultados e Discussão

3.2.1. Avaliação da capacidade antagônica de actinobactérias contra *Sclerotinia sclerotiorum*

Dos 354 isolados avaliados, 55 mostraram atividade antagônica, sendo 31 do manguezal, 16 do cerrado e 8 da caatinga (Tabela 1). Em total, foram obtidos 55 isolados com atividade antifúngica, 18 isolados apresentaram inibição entre 0 e 35 %, entretanto 35 apresentaram inibição entre 36 e 70 %, por último dois isolados apresentaram inibição acima de 70%. O processo de triagem adequado é relevante no momento de escolher um agente de controle biológico, principalmente, devendo-se considerar as características fisiológicas tanto do fitopatógeno quanto do antagonista. A técnica de cultivo dual (Antagonismo direto) é ensaio comumente usado para avaliar a capacidade antagônica dos isolados de actinobactérias (Adhilakshmi et al., 2014). Este estudo coincide com resultados anteriores (Nakaew et al., 2015) que relatam o gênero *Streptomyces* como predominante quando é feito isolamento de solo e rizosfera, porém tem se destacado como potencial antagonista e produtor de compostos antifúngicos (Rashad et al., 2015).

A técnica de Antagonismo direto é a mais amplamente usada na seleção de isolado com alguma capacidade antagônica *in vitro*. A principal função desse teste é eliminar os isolado menos efetivos, permitindo diminuir o número de isolados para serem testados em condições de casa de vegetação. Entretanto, existem situações especiais nas quais alguns microrganismos não afetam diretamente o agente etiológico da doença, todavia tem um efeito indireto, como por exemplo, estimulação de crescimento vegetal ou ativação do sistema de defesa da planta (Narayanasamy 2013).

3.2.2. Inibição do crescimento de micelial e da germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

Neste trabalho, foi encontrado que o crescimento micelial e germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* foram fortemente afetados pelas actinobactérias (Tabela 1). Esses resultados são consistentes com os previamente publicados de Zhu et al., 2008, Han et al., 2011 e Cheng et al., 2014. Entre os isolados avaliados, 17 apresentaram inibição do micélio e 8 isolados inibiram escleródios de *S. sclerotiorum* (Tabela 1). Com o fim de identificar os isolados com maior potencial de antagonismo, foram selecionados aqueles com a porcentagem ≤ 50 , tanto na inibição do crescimento micelial, quanto na germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum*. Para o crescimento micelial, os isolados Can V2 17 (50%), Can V2 22 (90%), Bc V3 01f (100%), Can V2 18f (70%), 1AS2a(50%), Caat P5 55 (60%), Caat P8 78 (100%), Caat P8 79 (80%) e Caat P5 102 (80%) apresentaram valores acima desse ponto, enquanto a germinação de escleródios, os isolados Bc V2 18 (60%), Bc V1 37 (80%), 1AS2 (70%), 1AS6 (70%), 1AS2a(70%), 2BS1 (100%), Caat P5 55 (70%) e Caat P8 79 (90%) foram os mais destacados. Somente os isolados 1AS2a, Caat P5 55 e Caat P8 79 apresentaram inibição $\leq 50\%$ em ambos os testes. Em condições favoráveis, o escleródio pode germinar e formar novo micélio ou germinar e produzir apotécios que vão diretamente liberar ascósporos (Thaning et al., 2001). Portanto o escleródio passa ser a parte fundamental do Mofo Branco em campo. Com os resultados obtidos, o atraso ou inibição do inóculo primário da doença pode favorecer o desenvolvimento da planta e diminuir o período de susceptibilidade a ser colonizada pelo fungo (Cheng et al, 2014).

3.2.3. Compatibilidade com rizobactérias

Todas as actinobactérias apresentaram compatibilidade com as bactérias benéficas do solo, exceto o isolado Caat P8 35 (Tabela 1). Esses Microrganismos apresentam características específicas que são favoráveis ao desenvolvimento da cultura da soja. No caso do *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium japonicum* ambos simbioses da cultura da soja, são os encarregados de fixar o nitrogênio para o desenvolvimento da planta (Rhijn et al., 1995). *B. Japonicum* é o principal formador de nódulos nas raízes de soja, portanto um Microrganismo que se pretende usar como bioinoculante deve conseguir se estabelecer na rizosfera da soja sem afetar o desenvolvimento desta bactéria simbiote. O isolado *Azospirillum* sp. descrito como de Exopolissacarídeos (EPS) e Biofilme, favorecendo o desenvolvimento da planta com que se associa. Tem sido descrito inoculações conjuntas de vários dos

Microorganismos avaliados neste estudo no cultivo da soja, que representaram resultados favoráveis na formação de nódulos, comprimento da parte aérea e da raiz (Molla 2001; Juge et al, 2012). A coinoculação de duas ou mais bactérias estimuladoras de crescimento evidenciou maior efeito quando comparadas com inoculações individuais (Barka 2006), a mistura das bactérias mostrou melhor fixação de nitrogênio, controle de patógenos, produção de fitohormônios (Kloepper et al. 2004; Tsavkelova et al. 2006). O cultivo da soja precisa de um microbioma diverso para o seu ótimo desenvolvimento, condições de solo estéril pode limitar seu crescimento inclusive associado à Rizóbios (Harris 1953). Considerando que além das relações simbióticas da soja com os Rizóbios, este cultivo tem demonstrado certa seletividade para se associar com algumas espécies de bactérias, entre elas: *Bradyrhizobium* e *Streptomyces* (Sugiyama et al. 2014). A coinoculação com isolados de actinobactérias e bactérias diazotróficas pode ser uma estratégia a ser avaliada como parte do manejo integrado da soja.

3.2.4. Caracterização Molecular dos isolados de Actinobactérias

O sequenciamento do gene ribossômico 16S rRNA tem sido amplamente usado como a abordagem básica para identificação de Microorganismos, assim como uma ferramenta em destaque para conhecer a diversidade microbiana em diferentes ambientes naturais (Solanki et al., 2014). Com os fragmentos do gene 16s rRNA obtidos (entre 1407 – 1528 pb) foi feita a análise baseada no alinhamento da sequência parcial do gene 16s rRNA e comparados com sequências de linhagens tipo utilizando o servidor EzTaxón-e (Kim et al., 2012), o qual evidenciou que os isolados avaliados tem alta similaridade com quatro gêneros de actinobactérias, são eles: *Streptomyces* (49 isolados), *Micromonospora* (4), *Kocuria* (1) e *Actinomadura* (1). O gênero *Streptomyces* representou 89% dos isolados, como tem sido descrito o gênero *Streptomyces* é um comum e abundante habitante do solo em diferentes ecossistemas (Tabela 1), neste estudo, foi encontrado maior predominância deste gênero considerando os três biomas acessados, o que coincide com reportes prévios de outros autores que descrevem maior abundância de *Streptomyces* sp. em diferentes ambientes (Qin et al. 2009, Nimaichand et al. 2015). A análise da sequência dos 49 isolados de *Streptomyces* evidenciou o agrupamento em diferentes grupos gênicos, sendo assim, foram 24 isolados no grupo 1, quatro isolado no grupo 2, três isolados no grupo 3, cinco isolados no grupo 4 e treze isolados no grupo 5 (Figura 1).

Tabela 1. Afiliação genética dos 55 isolados de actinobactérias usando o gene 16s rRNA avaliados para controle biológico de *S. sclerotiorum*.

	Isolado	Especie mais proxima	Cod. Acesso	% Similaridade	pb	diff. Ntd	
Manguezal	Can V1 07	<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 ⁽⁷⁾	AB184868	99.93	1489	1/1446	
	Can V1 22	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1412	0/1408	
	Can V1 37	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1491	0/1444	
	Can V1 58	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1489	0/1444	
	Can V1 52f	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837 ⁽⁷⁾	U58532	100	1454	6/1408	
	Can V2 11	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1480	0/1444	
	Can V2 39	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1479	0/1445	
	Can V2 06f	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1447	0/1430	
	Can V2 11f	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1412	0/1408	
	Can V2 13	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1492	0/1444	
	Can V2 15	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1455	0/1444	
	Can V2 17	<i>Streptomyces violascens</i> ISP 5138 ⁽⁷⁾	AY999737	99.22	1482	11/1416	
	Can V2 32f	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1482	0/1444	
	Can V2 33f	<i>Streptomyces griseolus</i> NRRL B- 2925 ⁽⁷⁾	JOFC0100069	99.72	1495	4/1444	
	Can V2 37f	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1480	0/1444	
	Can V3 62f	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1491	0/1444	
	Can V2 22	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1478	0/1444	
	Bc V2 18f	<i>Micromonospora siamensis</i> TT2-4 ⁽⁷⁾	AB193565	99.79	1468	3/1399	
	Bc V3 01f	<i>Streptomyces griseolus</i> NRRL B- 2925 ⁽⁷⁾	JOFC0100069	99.65	1477	5/1440	
	Bc V3 14f	<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 ⁽⁷⁾	AB184868	100	1477	0/1449	
	Can V2 18f	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1421	0/1418	
	Can V2 22f	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1468	0/1444	
	Bc V1 06	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	99.13	1407	12/1383	
	Bc V1 06f	<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 ⁽⁷⁾	AB184868	99.23	1445	11/1422	
	Bc V3 18f	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ⁽⁷⁾	AB241454	99.93	1469	1/1428	
	Bc V2 18	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1475	0/1444	
	Bc V1 20f	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1492	0/1444	
	Bc V3 05f	<i>Micromonospora chalicea</i> DSM 43026 ⁽⁷⁾	X92594	99.72	1464	4/1436	
	Bc V3 10f	<i>Streptomyces griseolus</i> NRRL B- 2925 ⁽⁷⁾	JOFC0100069	99.72	1473	0/1448	
	Can V2 34	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1463	0/1444	
	Bc V1 37	<i>Kocuria koreensis</i> P31 ⁽⁷⁾	FJ607612	99.04	1486	14/1451	
	Cerrado	1 AS 2	<i>Streptomyces globosporus</i> NRBC 12867 ⁽⁷⁾	AB184203	99.65	1491	5/1440
		3 AS 4	<i>Streptomyces rishiriensis</i> NBRC 13407 ⁽⁷⁾	AB184383	99.03	1493	14/1444
1 AS 6		<i>Streptomyces phaeopurpureus</i> DSM 40125 ⁽⁷⁾	KQ948198	99.93	1485	1/1440	
1 BR 6		<i>Streptomyces phaeopurpureus</i> DSM 40125 ⁽⁷⁾	KQ948198	99.45	1492	8/1443	
3 BS 2		<i>Streptomyces pratensis</i> ch24 ⁽⁷⁾	JQ806215	99.34	1490	9/1369	
1 BR2		<i>Streptomyces albolongus</i> NBRC 13465 ⁽⁷⁾	AB184425	99.72	1477	4/1447	
2 BR 2		<i>Streptomyces flocculus</i> NRRL B-2465 ⁽⁷⁾	LIQO01000098	99.03	1488	14/1445	
3 AR 7		<i>Streptomyces xiamenensis</i> MCC 1A01550 ⁽⁷⁾	EF012099	99.24	1491	11/1442	
1 AS 2a		<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC 13026 ⁽⁷⁾	AB184264	99.93	1528	1/1448	
1 AS 2c		<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC 13026 ⁽⁷⁾	AB184264	98.17	1448	26/1422	
2 BS 5		<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC 13026 ⁽⁷⁾	AB184264	99.36	1439	9/1416	
1 BR 5		<i>Streptomyces albolongus</i> NBRC 13465 ⁽⁷⁾	AB184425	99.86	1458	2/1433	
2 BS 1		<i>Streptomyces phaeopurpureus</i> DSM 40125 ⁽⁷⁾	KQ948198	99.24	1484	11/1439	
3 BS 4		<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ⁽⁷⁾	Z76676	100	1475	0/1444	
2 BR 3		<i>Streptomyces koyangensis</i> VK-A60 ⁽⁷⁾	AY079156	99.36	1414	9/1401	
2 BS 7		<i>Streptomyces actinomycinicus</i> RCU-197 ⁽⁷⁾	LC069046	98.90	1430	15/1362	
Caatinga		Caat P5 - 55	<i>Streptomyces rochei</i> NRBC 12908 ⁽⁷⁾	AB184237	97.77	1461	32/1434
	Caat P8- 52	<i>Streptomyces cuspidosporus</i> NBRC 12378 ⁽⁷⁾	AB184090	99.58	1484	6/1425	
	Caat P8 - 78	<i>Actinomadura montaniterrae</i> CYP1-1B ⁽⁷⁾	LC126428	99.03	1475	14/1439	
	Caat P8 - 79	<i>Streptomyces albolongus</i> NBRC 13465 ⁽⁷⁾	AB184425	99.72	1477	4/1444	
	Caat P5 -102	<i>Streptomyces anandii</i> NRRL B-3590 ⁽⁷⁾	AY999803	99.38	1482	9/1445	
	Caat P8- 34	<i>Streptomyces griseolus</i> NRRL B- 2925 ⁽⁷⁾	JOFC0100069	99.86	1484	2/1447	
	Caat P8 - 35	<i>Streptomyces levis</i> NBRC 15423 ⁽⁷⁾	AB184670	98.46	1472	22/1428	
	Caat P8 - 47	<i>Streptomyces prasinosporus</i> NRRL B-12431 ⁽⁷⁾	DQ026655	99.03	1494	14/1443	

Cod. Acesso: Código do Eztaxon da espécie tipo mais próxima; pb: Tamanho do fragmento 16s amplificado e sequenciado; diff. Ntd; Nucleotídeos diferentes/total da sequência comparada

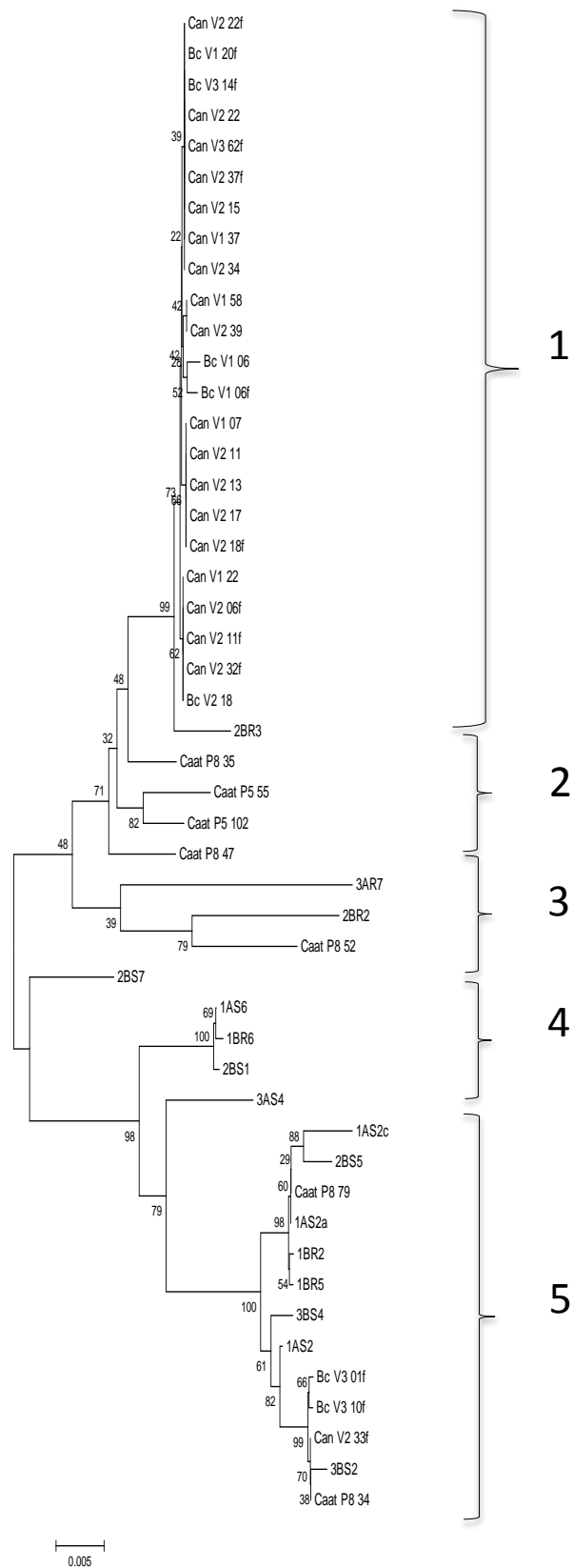


Figura 1. Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* obtidas neste estudo, baseado no método evolutivo de Neighbour-Joining. A árvore consenso foi inferida com bootstrap para 1.000 réplicas

Do gênero *Streptomyces* foram identificadas 19 espécies diferentes, sendo a espécie de *S. albidoflavus* (20 isolados) a mais abundante (Tabela 1). *S. albidoflavus* é um reconhecido produtor de enzimas, principalmente quitinases com capacidade de inibir o crescimento de algumas espécies de fungos fitopatógenos (Brzezinska et al. 2013). Os isolados Can V1 07, Bc V3 14f e Bc V1 06f ficaram mais próximos da linhagem tipo *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T (Figura 2). *S. hydrogenans* NBRC 13475^T é considerado uma actinobactéria cosmopolita, sendo encontrada em vários habitats, porém foi primeiramente descrito por Lindner et al. (1958), com a espécie tipo isolada do solo. Essa espécie já foi relatada pela sua capacidade antifúngica e estimuladora de crescimento de plantas (Kaur e Kumari 2013) além de apresentar atividade larvicida (Kaur et al. 2014).

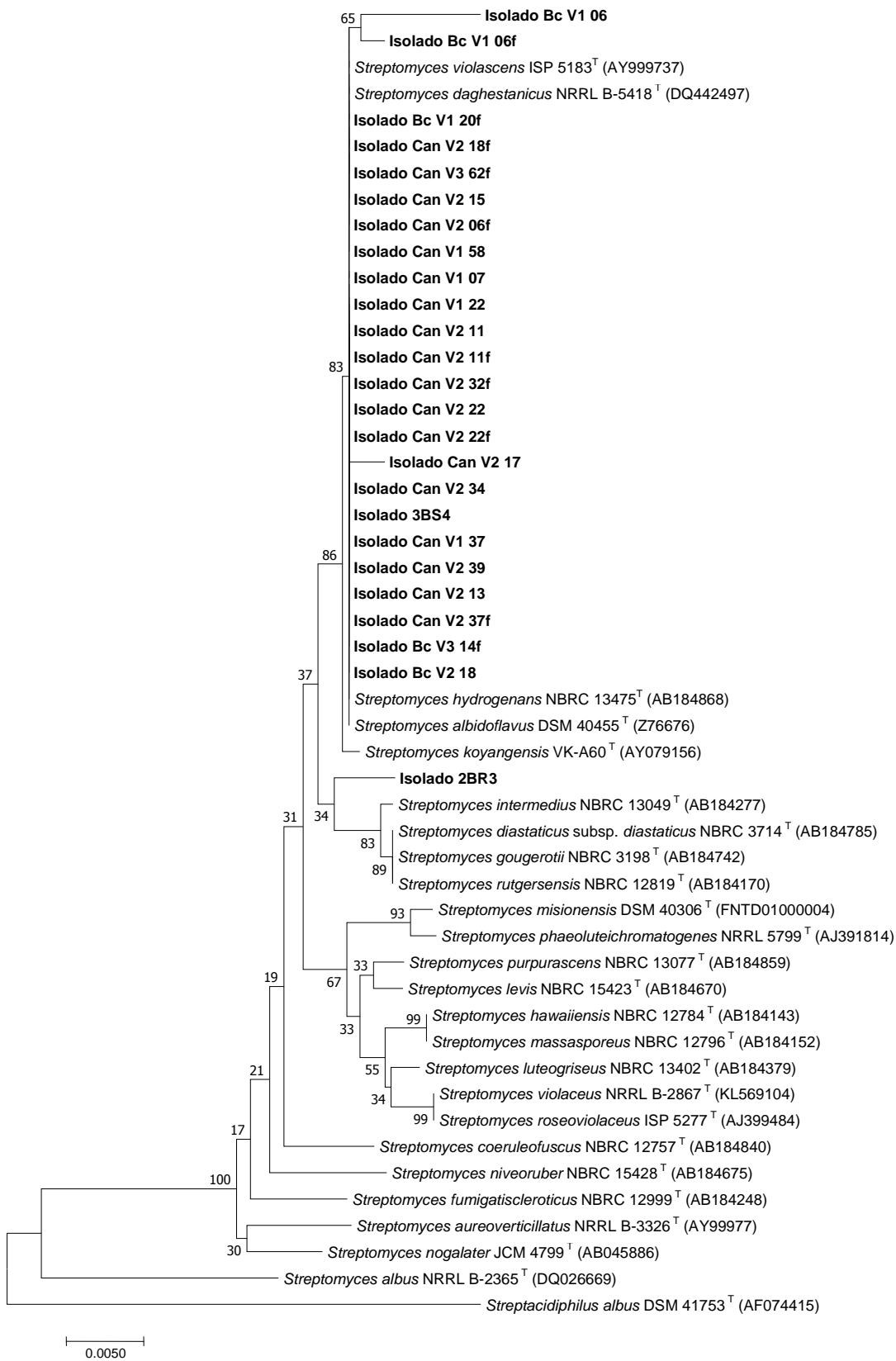


Figura 2. Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* do **Subgrupo 1** e as correspondentes linhagens tipo mais próximas. A árvore consenso foi inferida com bootstrap para 1.000 réplicas baseado no método evolutivo de Neighbour-Joining.

O isolado Can V2 17 apresentou similaridade 99.22% com *Streptomyces violascens* ISP 5138^T, espécie destacada produtora de metabólitos secundários (Choudhary et al. 2015; Zheng et al. 2016). O isolado 2BR3 ficou mais próximo do *Streptomyces koyangensis* VKA60^T esse microrganismo tem sido descrito como produtor de compostos que inibem fungos patógenos de plantas (Lee et al. 2005). O isolado 1AS2, com 99.65% de similaridade é mais próximo da linhagem tipo *Streptomyces globisporus* NRBC 12867^T (Figura 6) essa espécie tem sido reportada como produtora de compostos voláteis para o controle do fungo *Botrytis cinérea* (Li et al. 2012). O isolado 3AS4 apresentou 98.87% de similaridade com *Streptomyces rishiriensis* NBRC 13407^T, que tem sido reconhecido como produtor de compostos antimicrobianos (Charousová et al. 2015) e estimulador de crescimento em plantas, principalmente atuando como solubilizador de fósforo (Le et al. 2015). Os isolados 1AS6, 1BR6 e 2BS1 apresentaram similaridade com a espécie *Streptomyces phaeopurpureus* NRRL B-2260^T de 99.93, 99.45 e 99.24% respectivamente (Figura 5), essa espécie foi reportada como produtora de enzimas extracelulares com capacidade de inibir a germinação e adesão de estruturas de penetração de fungos especialmente espécies do gênero *Colletotrichum* (Palaniyandi et al. 2013).

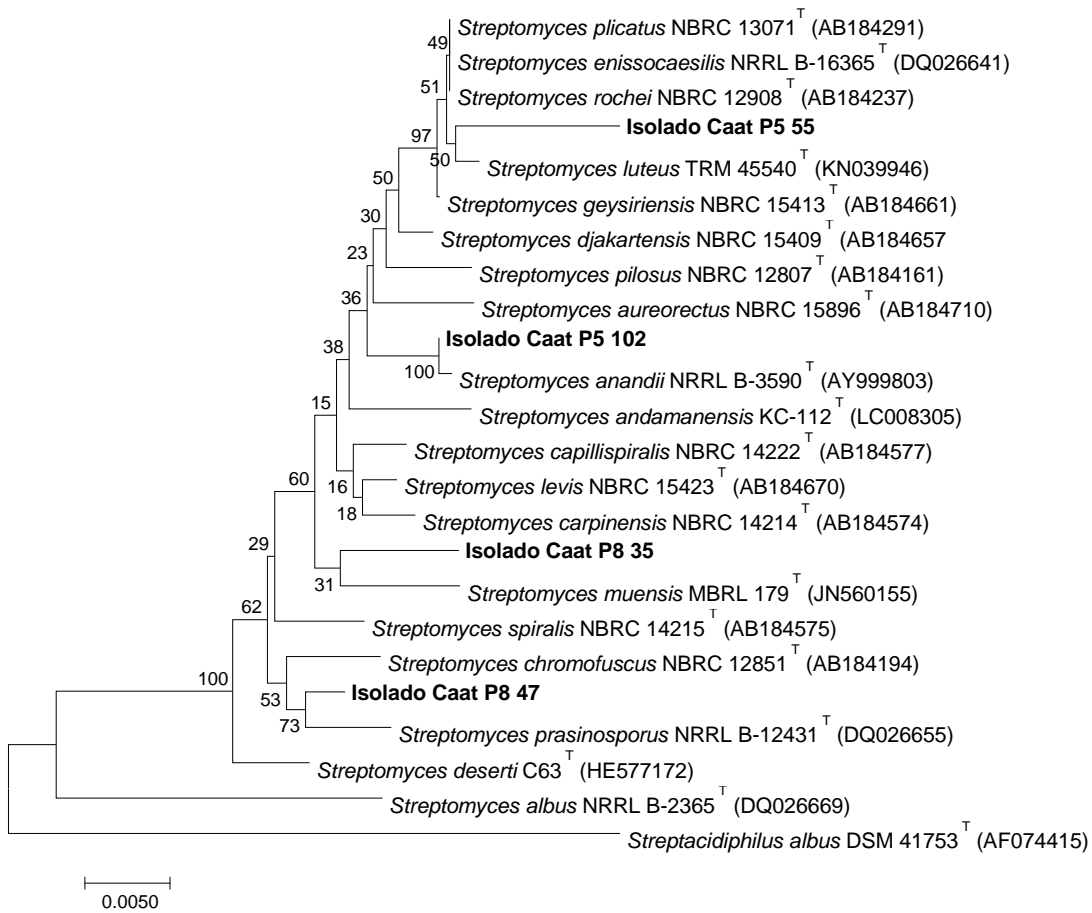


Figura 3. Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* do **Subgrupo 2** e as correspondentes linhagens tipo mais próximas. A árvore consenso foi inferida com bootstrap para 1.000 réplicas baseado no método evolutivo de Neighbour-Joining.

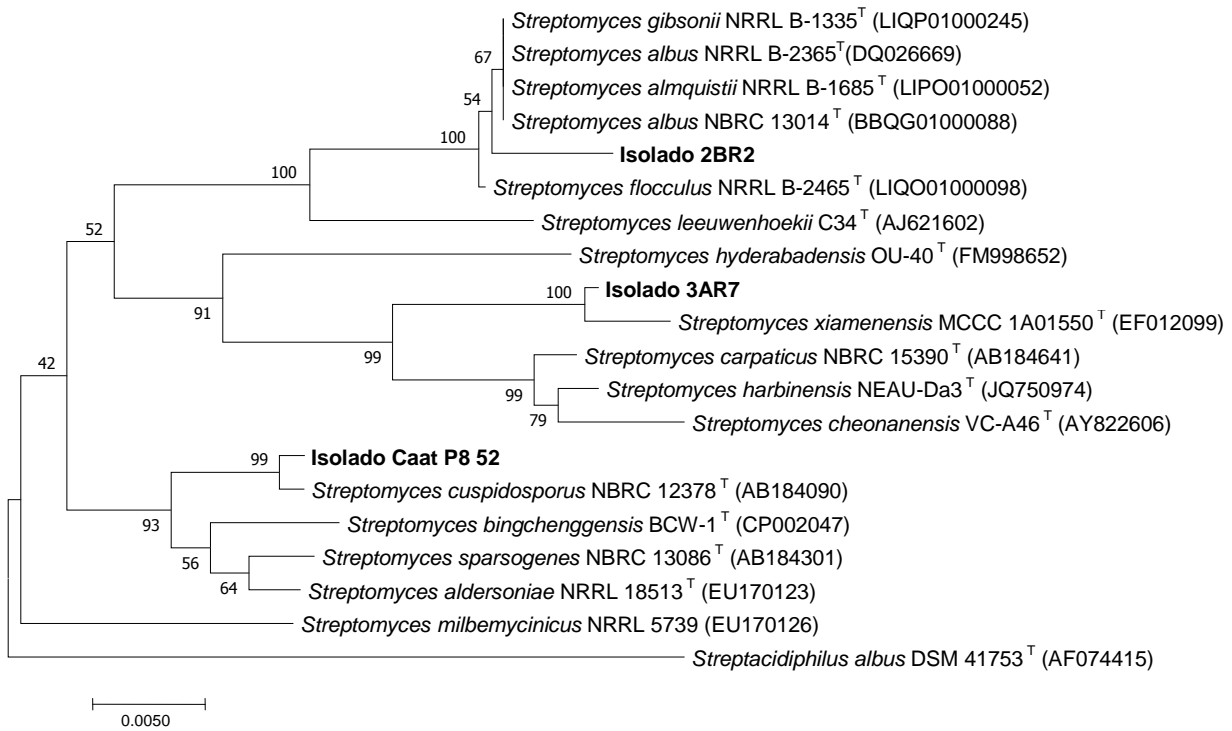


Figura 4. Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* do **Subgrupo 3** e as correspondentes linhagens tipo mais próximas. A árvore consenso foi inferida com bootstrap para 1.000 réplicas baseado no método evolutivo de Neighbour-Joining.

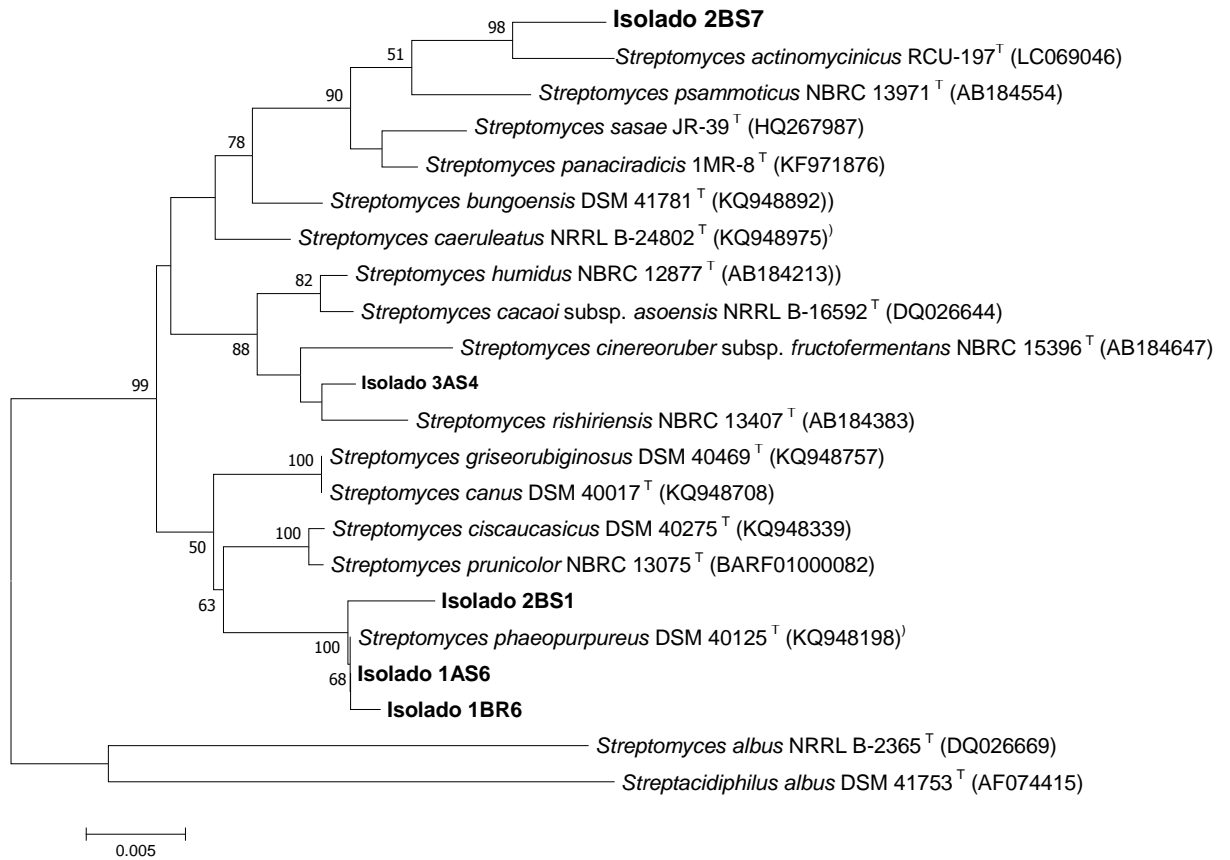


Figura 5. Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* do **Subgrupo 4** e as correspondentes linhagens tipo mais próximas. A árvore consenso foi inferida com bootstrap para 1.000 réplicas baseado no método evolutivo de Neighbour-Joining.

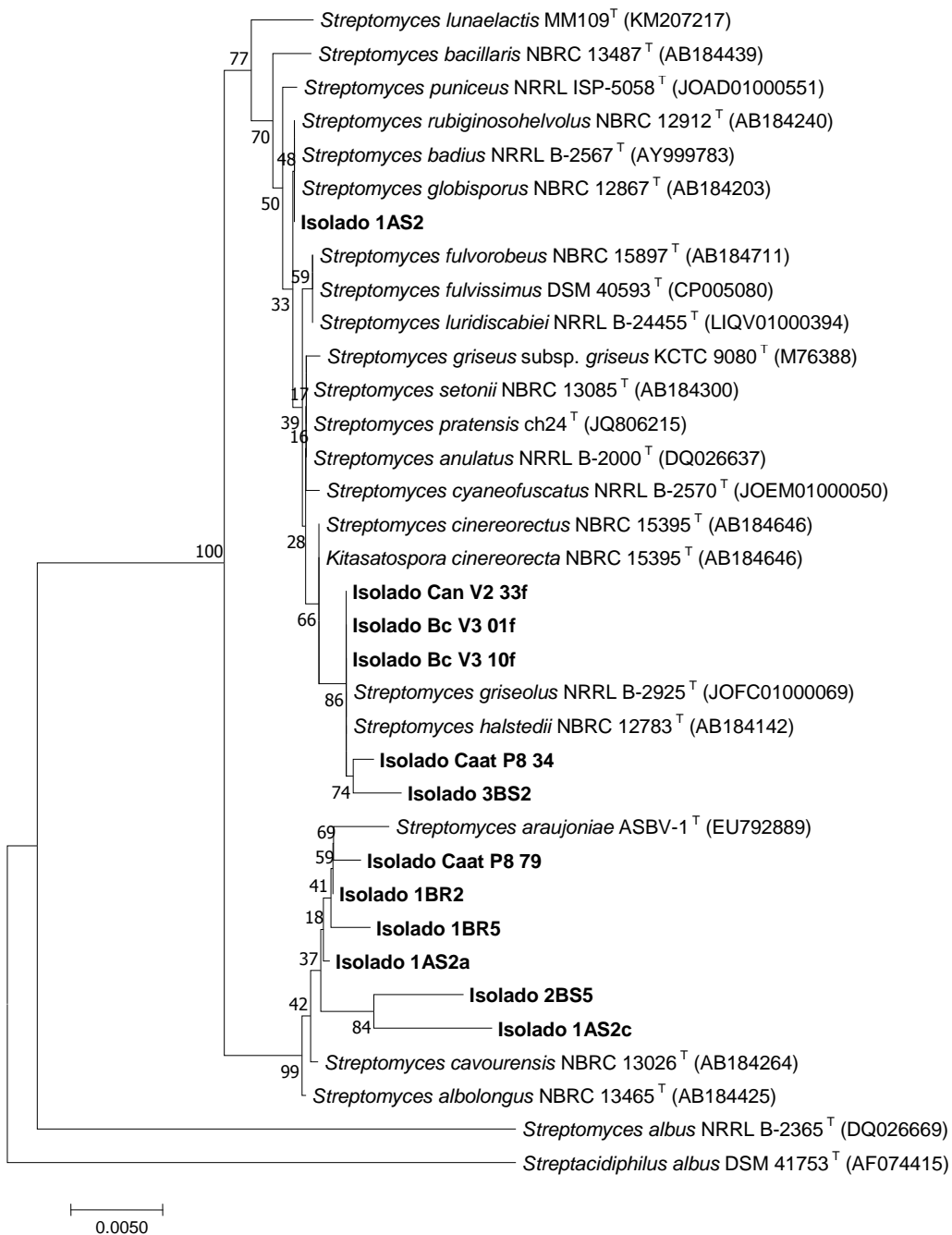


Figura 6. Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* do **Subgrupo 5** e as correspondentes linhagens tipo mais próximas. A árvore consenso foi inferida com bootstrap para 1.000 réplicas baseado no método evolutivo de Neighbour-Joining.

Tabela 2. Características avaliadas nos isolados de Actinobactéria. Crescimento de bactérias diazotróficas: Abundante (+++), Moderado (++), Pouco (+); Solubilização de Fósforo: Negativa (neg), Positiva (POS); Porcentagem de inibição da germinação de estruturas de *S. sclerotiorum*.

(Continua)

Isolado	Antagonismo (%)	Crescimento de bactérias diazotróficas			Solubilização de Fósforo		Inibição da germinação de <i>S. sclerotiorum</i> (%)	
		<i>Rhizobium</i> sp.	<i>B. japonicum</i>	<i>Azospirillum</i> sp.	Inorgânico	Orgânico	Discos de Micélio	Esclerodios
Can V1 07	49.50	+++	++	neg	neg	neg	0	0
Can V1 22	73.63	+++	++	neg	neg	neg	0	0
Can V1 37	61.19	+++	+++	neg	neg	neg	0	0
Can V1 58	40.55	+++	+	neg	neg	neg	0	0
Can V1 52f	11.69	+++	++	neg	neg	neg	0	0
Can V2 11	34.33	+++	+	neg	neg	neg	0	0
Can V2 39	49.25	+++	++	neg	neg	neg	0	0
Can V2 06f	31.09	+++	++	neg	neg	neg	0	0
Can V2 11f	46.52	+++	++	neg	neg	neg	0	0
Can V2 13	48.51	+++	+	neg	neg	neg	0	0
Can V2 15	33.08	+++	++	neg	neg	neg	20	0
Can V2 17	37.31	+++	+	neg	neg	neg	50	0
Can V2 32f	48.26	+++	+	neg	neg	neg	0	0
Can V2 33f	63.18	+++	+	+	neg	neg	0	0
Can V2 37f	28.61	+++	++	neg	neg	neg	30	0
Can V3 62f	19.65	+++	neg	neg	neg	neg	20	0
Can V2 22	41.79	+++	++	neg	neg	neg	90	0
Bc V2 18f	22.47	+++	+	neg	neg	neg	0	0
Bc V3 01f	13.43	+++	neg	neg	POS	neg	100	0
Bc V3 14f	51.89	+++	++	neg	neg	neg	20	0

Tabela 2. Características avaliadas nos isolados de Actinobactéria. Crescimento de bactérias diazotróficas: Abundante (+++), Moderado (++) , Pouco (+); Solubilização de Fósforo: Negativa (neg), Positiva (POS); Porcentagem de inibição da germinação de estruturas de *S. sclerotiorum*..

(Continuação)

Isolado	Antagonismo (%)	Crescimento de bactérias diazotróficas			Solubilização de Fósforo		Inibição da germinação de <i>S. sclerotiorum</i> (%)	
		<i>Rhizobium sp.</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>Azospirillum sp.</i>	Inorgânico	Orgânico	Discos de Micélio	Escleródios
Can V2 18f	47.26	+++	++	neg	neg	neg	70	0
Can V2 22f	82.09	+++	++	neg	neg	neg	0	0
Bc V1 06	37.31	+++	++	neg	POS	POS	0	0
Bc V1 06f	55.7	+++	++	+++	neg	neg	0	0
Bc V3 18f	20.15	+++	+++	neg	neg	neg	0	0
Bc V2 18	38.06	+++	++	neg	neg	neg	0	60
Bc V1 20f	52.74	+++	++	neg	neg	neg	0	0
Bc V3 05f	25.99	+++	+	neg	neg	POS	0	0
Bc V3 10f	43.8	neg	+++	neg	neg	neg	0	0
Can V2 34	35.9	+	+++	+++	neg	neg	0	0
Bc V1 37	40.9	++	+++	++	neg	neg	0	80
1 AS 2	54.85	+	neg	+	neg	neg	0	70
3 AS 4	47.82	+++	+	neg	POS	POS	20	0
1 AS 6	41.99	neg	neg	neg	neg	neg	0	70
1 BR 6	31.80	neg	neg	neg	neg	neg	0	0
3 BS 2	34.95	+++	+	+	neg	POS	0	0
1 BR2	29.13	++	neg	+	neg	neg	0	0
2 BR 2	34.47	+	neg	neg	neg	neg	0	0
3 AR 7	47.09	+++	neg	neg	neg	neg	0	0

Tabela 2. Características avaliadas nos isolados de Actinobactéria. Crescimento de bactérias diazotróficas: Abundante (+++), Moderado (++), Pouco (+); Solubilização de Fósforo: Negativa (neg), Positiva (POS); Porcentagem de inibição da germinação de estruturas de *S. sclerotiorum*.

(Conclusão)

Isolado	Antagonismo (%)	Crescimento de bactérias diazotróficas			Solubilização de Fósforo		Inibição da germinação de <i>S. sclerotiorum</i> (%)	
		<i>Rhizobium sp.</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>Azospirillum sp.</i>	Inorgânico	Orgânico	Discos de Micélio	Esclerodios
1 AS 2a	55.34	+++	+	+	neg	neg	50	70
1 AS 2c	60.90	+++	neg	neg	neg	neg	0	0
2 BS 5	58.98	++	neg	neg	neg	POS	0	0
1 BR 5	45.63	++	neg	neg	neg	neg	0	0
2 BS 1	23.06	+++	neg	neg	neg	neg	0	100
3 BS 4	35.44	+++	+	+	neg	neg	0	0
2 BR 3	48.06	++	neg	+	neg	neg	30	0
2 BS 7	30.27	+++	neg	neg	neg	POS	0	0
Caat P5 - 55	33.74	+++	+	neg	neg	neg	60	70
Caat P8 - 52	45.15	+++	neg	neg	neg	neg	0	0
Caat P8 - 78	42.23	+	neg	neg	neg	neg	100	0
Caat P8 - 79	42.48	+++	+++	+++	neg	POS	80	90
Caat P5 -102	49.76	+++	neg	neg	neg	neg	80	0
Caat P8- 34	22.82	+++	neg	neg	neg	neg	20	0
Caat P8 - 35	28.88	neg	neg	neg	neg	neg	0	0
Caat P8 - 47	47.33	++	+	+	neg	neg	20	0
CONTROLE	0.00	+++	+++	+++	neg	neg	0	0

O isolado 2BR2 apresentou 99.03% de similaridade com a linhagem *Streptomyces flocculus* NRRL B-2465^T, previamente descrita por Wallace et al. (1990) como produtor de composto antitumoral streptonigrina. O isolado 3AR7 mostrou 99.24% de similaridade com *Streptomyces xiamenensis* MCC 1A01550^T. *S. xiamenensis* tem sido isolado de sedimento de manguezais e produtor de compostos com atividade biológica (Xu et al. 2009). Entretanto o isolado 2BS7 apresentou similaridade de 98.90% com *Streptomyces actinomycinicus* RCU 197^T espécie produtora de actinomicina, um destacado agente antibacteriano e antitumoral (Koba e Konopa 2005). O isolado Caat P5 55 apresentou 97.77% de similaridade com *Streptomyces rochei* NBRC 12908^T, Zhang et al, (2016) relataram que um isolado dessa espécie apresentou uma excepcional produção de enzimas glucanase, quitinase e além disso foi evidente o efeito de estimulação de crescimento no cultivo de maçã. O isolado Caat P8 52 tem 99.58% com a linhagem *Streptomyces cuspidosporus* NBRC 12378^T, *S. cuspidosporus* tem sido reportado como destacado produtor de enzimas, principalmente xylanases (Maheswari e Chandra 2000). Caat P5 102 teve 99.12% de similaridade com *Streptomyces anandii* NBRC B-3590^T, espécie usualmente isolado de solo (Batra e Bajaj 1965) e conhecida produtor de agentes antitumorais (Balitz et al, 1981). O isolado Caat P8 35 demonstrou 98.46% de similaridade com *Streptomyces levis* NBRC 15423^T destacado produtor de compostos antibacterianos (Singh et al, 2016). O isolado Caat P8 47 foi mais próximo com a linhagem de *Streptomyces prasinosporus* NRRL B-12431^T. *S. prasinosporus*, normalmente isolado de solo, é descrito como destacado produtor de compostos antibacterianos, principalmente com espécies patogênicas de humanos (Rajput et al. 2012). Os isolados Can V2 33f, Bc V3 01f, Bc V3 10f e Caat P8 34, evidenciaram maior proximidade (99.72, 99.65, 99.72 e 99.86% respectivamente) com a linhagem tipo *Streptomyces griseolus* NRRL B-2925^T essa espécie e destacada produtora do antibiótico anisomicina (Abdel-Aal et al, 2011). Sendo assim da mesma forma, o isolado 3BS2 apresentou 99.34% de similaridade com a linhagem *Streptomyces pratensis* ch24^T. O gênero *S. pratensis* já foi descrito como destacado produtor de compostos antibióticos e antitumorais (Rashad et al. 2015). O isolado 1AS2 apresentou similaridade de 99.65% com *Streptomyces globisporus* NBRC 12867^T espécie que tem sido descrita como produtora dos compostos antitumorais Landomycina A e E (Rebets et al, 2003). Os isolados 1BR2, 1BR5 e Caat P8 79 apresentaram similaridade de 99.72%, 99.86% e 99.72% respectivamente com a linhagem tipo *Streptomyces albolongus* NBRC 13465^T, espécie

que tem sido descrita como produtora dos compostos antibióticos griseoviridina e etamicina (Terekhova et al, 1992). Os isolados 1AS2a, 1AS2c e 2BS5 apresentaram similaridade entre 99.93%, 98.17% e 99.36% com a linhagem tipo *Streptomyces cavourensis* NBRC 13026^T, já foi reportado como produtor de macrolídeos com atividade antifúngica (Xu et al. 2013).

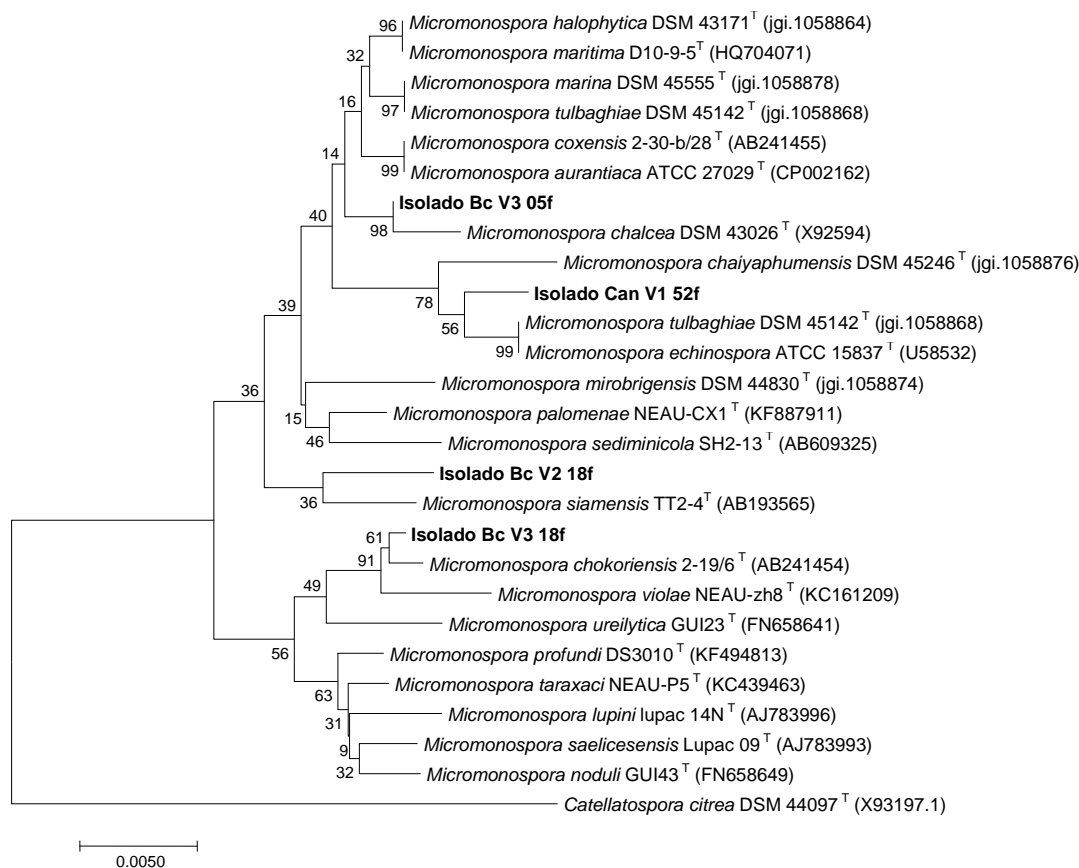


Figura 7. Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rDNA dos isolados de *Micromonospora* e as correspondentes linhagens tipo mais próximas. A árvore consenso foi inferida com bootstrap para 1.000 réplicas baseado no método evolutivo de Neighbour-Joining.

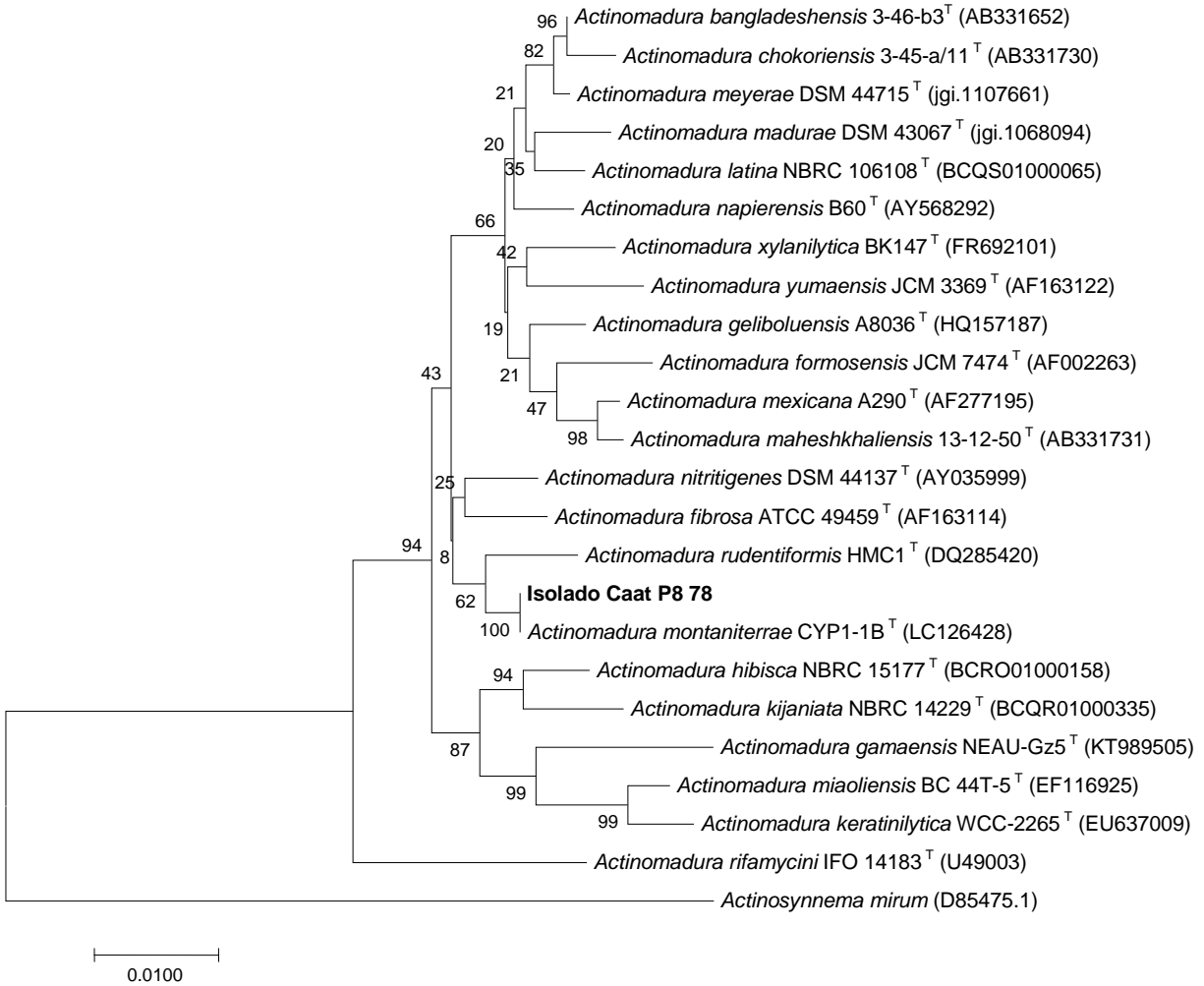


Figura 8. Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA dos isolados de *Actinomadura* e as correspondentes linhagens tipo mais próximas. A árvore consenso foi inferida com bootstrap para 1.000 réplicas baseado no método evolutivo de Neighbour-Joining.

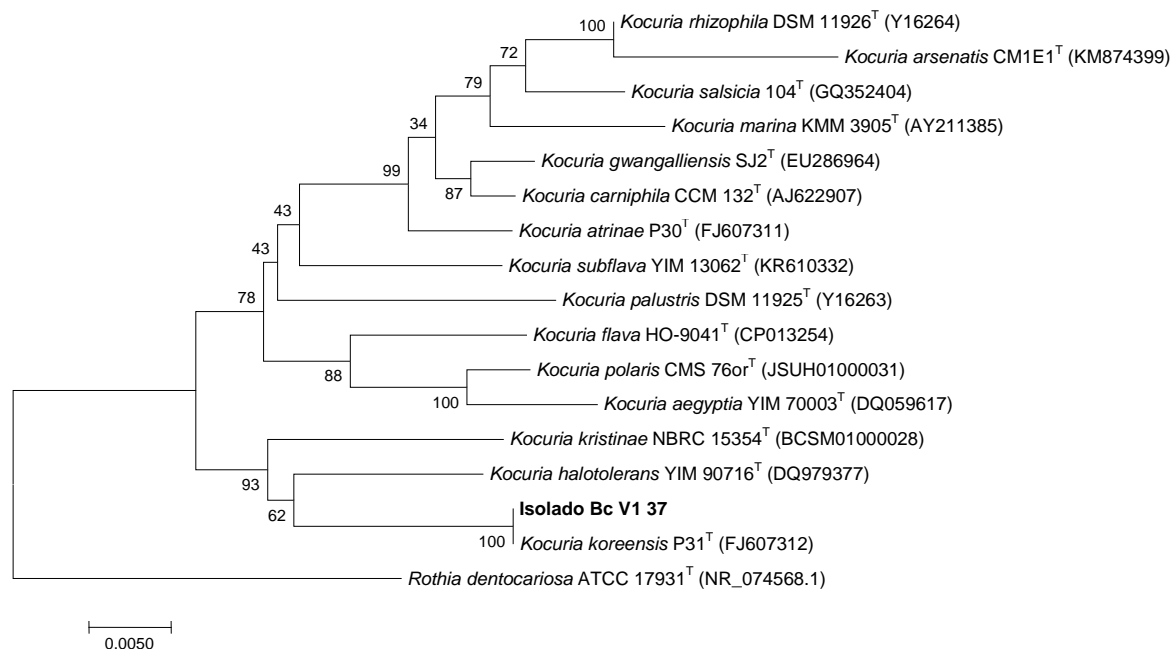


Figura 9. Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA dos isolados de *Kocuria* e as correspondentes linhagens tipo mais próximas. A árvore consenso foi inferida com bootstrap para 1.000 réplicas baseado no método evolutivo de Neighbour-Joining

No grupo dos não estreptomicetos (seis isolados no total) foram identificados isolados associados aos gêneros *Micromonospora* (4), *Actinomadura* (1) e *Kocuria* (1). No gênero *Micromonospora*, o isolado Can V1 52f apresentou 99.54% de similaridade com a linhagem *M. echinospora* ATCC 15837^T, Bc V2 18f apresentou 99.79% com *M. siamensis* TT2-4^T, Bc V3 05f 99.66% com *M. chalcea* DSM 43026^T e Bc V3 18f 99.86% com *M. chokoriensis* 2-19/6^T (Figura 6). Esse gênero bacteriano pertencente à família *Micromonosporaceae*, usualmente crescem formando micélio ramificado e abundante. Os esporos têm sido descritos como importantes produtores de compostos bioativos e recentemente na interação planta-microrganismo, cumprindo a função de controlador biológico (Hirsch e Valdés 2010). O isolado Caat P8 78 teve 98.61% de similaridade com a linhagem *Actinomadura nitrigenes* DSM 44137^T (Figura 7) espécie descrita por Lipski e Altendorf (1995) como uma nova espécie produtora de nitrito, essa espécie tem sido considerada de vital importância no ambiente devido à função que desempenha, ao converter a amônia em nitrato através do processo de nitrificação, durante esse processo o nitrito é formado como um produto intermediário. Se a conversão para nitrato é impedida, concentrações significantes de nitrito podem acumular no ambiente (Costa et al, 2008). O isolado Bc V1 37 apresentou 99.26%

com a linhagem tipo *Kocuria koreensis* P31^T (Figura 8) que é conhecida como produtora diversas atividades enzimáticas (Nwagu e Amadi 2013). Como usualmente denominados (em inglês "Non-streptomycete actinomycetes") os "NSA" têm se destacado como bons produtores de antibióticos. No trabalho de El-Tarabily e Sivasithamparam (2006) são reportados alguns dos principais antibióticos produzidos por NSA. No caso de *Actinomadura*, destaca-se a produção de simaomicina e pradimicina. No gênero *Micromonospora* tem-se a já conhecida micromonosporina.

3.3. Conclusões

- Neste trabalho observou-se a diversidade de actinobactérias isoladas de solo e rizosfera de três biomas brasileiros, nossos resultados evidenciaram uma predominante prevalência de espécies do gênero *Streptomyces*.
- Os isolados de Actinobactérias apresentaram atividade antagônica pela técnica de cultivo dual contra *S. sclerotiorum*, entre 11.69 e 82.09 %.
- As bactérias diazotróficas avaliadas neste trabalho evidenciaram compatibilidade com as Actinobactérias antagônicas selecionadas.
- Dois isolados de Actinobactérias, Bc V1 06 e 3AS4, demonstraram capacidade de solubilizar tanto fósforo orgânico quanto fósforo inorgânico.
- Foi evidenciada a inibição do crescimento de micélio ativo e germinação de escleródios de *S. sclerotinia*, por parte de 22 isolados de Actinobactérias, sendo que três deles; 1AS2a, Caat P5 55 e Caat P8 79 apresentaram inibição em ambos casos entre 50 e 90%.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Aal TAM, Abdelwahed NAM, Awad G, El Diwany AI, Haroun BM. (2011) Improvement Of Anisomycin Production Through Mutation And Medium Optimization For *Streptomyces griseolus*. **Austral. J. of Basic and App. Sci.** 5(12): 2637-2648.
- Adhilakshmi M, Paranidharan V, Balachandar D, Ganesamurthy K, Velazhahan R, (2014). Suppression of root rot of mung bean (*Vigna radiata* L.) by *Streptomyces* sp. is associated with induction of peroxidase and polyphenol oxidase. **Arch. Phytopathol. Plant Prot.** 47 (5), 571–583.
- Aghighi S, Bonjar GHS, Rawashdeh R, Batayneh S, Saadoun I. (2004) First report of antifungal spectra of activity of Iranian Actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahlia* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Asian J. Plant. Sci.** 3: 463 – 471.
- Anderson AS, Wellington, EMH. (2001), the taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51, 797 – 814.
- Balitz DM, O'Herron FA, Bush J, Vyas DM, Nettleton DE, Grulich RE, Bradner WT, Doyle TW, Arnold E, Clardy J, (1981). Antitumor agents from *Streptomyces anandii*: gilvocarcins V, M and E. **Journal antibiotic.** 34:12; 1544 – 1555
- Barka EA, Nowak J, Clement C (2006) Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **Appl Environ Microbiol** 72: 7246–7252.
- Batra SK, Bajaj BS, (1965) *Streptomyces anandii* – a new species of *Streptomyces* isolated from soil. **Indian J Exp Biol.** 3:4; 240 – 242
- Brzezinska MS, Jankiewicz U, Burkowska A, (2013). Purification and characterization of *Streptomyces albidoflavus* antifungal components. **Appl. Biochem. and Microbiol.** 49-5. 451 – 457

- Charousová I, Javoreková S, Wink J. (2015). Isolation and characterization of *Streptomyces rishiriensis* (VY31) with antibiotic activity against various pathogenic microorganisms. **J micro, biotech and food sci.** 4:1; 23 – 27
- Cheng G, Huang Y, Yang H, Liu F, (2014) *Streptomyces felleus* YJ1: Potential Biocontrol Agents Against the *Sclerotinia* Stem Rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of Oilseed Rape. **Journal of Agricultural Science**; 6:4; 91 – 98.
- Choudhary B, Nagpure A, Gupta RK, (2015). Biological control of toxigenic citrus and papaya-rotting fungi by *Streptomyces violascens* MT7 and its extracellular metabolites. **J. Basic Microbiol.** 2015, 55, 1343–1356
- Costa W, Gálvez AO, Brito LO, Santos EL, (2008) Produção de ortofosfato, amônia, nitrito E nitrato no cultivo de *Litopenaeus vannamei* utilizando dietas com diferentes níveis de proteína vegetal e animal. **B. Inst. Pesca.** 34(2): 303 – 310.
- Cuesta G, De la Fuente RG, Abad M, Fornes F. (2012). Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. **J. Environ. Management.** 95; S280 - S284
- El-Tarabily KA, Sivasithamparam K, (2006) Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Soil Biology & Biochemistry.** 38. 1505 – 1520.
- Fernando WGD, Nakkeeran S, Zhang Y, Savchuk S, (2007) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. **Crop Protection** 26:100–107
- Gargouri S, Berraies S, Gharbi, MS, Paulitz T, Murray TD, Burgess LW, (2017) Occurrence of sclerotinia stem rot of fenugreek caused by *Sclerotinia trifoliorum* and *S. sclerotiorum* in Tunisia. **Eur J Plant Pathol.** 149:3: 587-597.

- Geraldine AM, Lopes FAC, Carvalho DDC, Barbosa ET, Rodrigues AR, Brandão RS, Ulhoa CJ, Junior ML, (2013) Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological control**. 67: 308 -316.
- Han LR, Sun PP, Zhang N. (2011). Isolation and screening of biocontrol actinomycetes against *Sclerotinia sclerotiorum* . **Journal of Anhui Agricultural Science**, 39:5;2668-2670.
- Harris JR (1953) Influence of rhizosphere micro-organisms on the virulence of *Rhizobium trifolii*. **Nature** 172:507–508.
- Hirsch AM, Valdés M, (2010) *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. **Soil biology and biochemistry**. 42: 536 – 542.
- Ilic SB, Konstantinovic SS, Todorovic ZB, Lazic ML, Veljkovic VB, Jokovic N, Radovanovic BC, (2007) Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in *Streptomyces* isolates. **Microbiol**. 76: 421 -428.
- Juge C, Prevost D, Bertrand A, Bipfubusa M, Chalifour FP (2012) Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. **Appl. Soil Ecol**. 61:147–157.
- Kaur T, Kumari RM, (2013). Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16. **J. Basic Microbiol**. 2013, 53, 1–11
- Kaur T, Vasudev A, Kaur SS, Kumari RM. (2014). Insecticidal and growth inhibitory potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16 on major pest of India, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Microbiology**. 14: 227.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J, (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 62: 3, 716-721.
- Koba M, Konopa J. (2005). Actinomycin D and its mechanisms of action. **Postepy Hig Dosw**, 59;290-8.

- Kloepper JW, Ryu C-M. (2006) Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. **Soil Biol** 9:33–52.
- Le XH, Franco CMM, Ballard RA, Drew AE, (2015) Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the early growth and nodulation of lucerne (*Medicago stiva* L.) **Plant Soil**. DOI 10.1007/s11104-015-2652-9
- Lee J, Yeon JY, Lee J, Yeop JY, Ho J, Won HW, Byung H, Kook BK (2005) *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butenoic acid. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55 :257-62.
- Li Q, Ning P, Zheng L, Huang J, Li G, Hsiang T (2012) Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biological Control**, 61, 2:13-120.
- Lindner F, Junk R, Neemann G, Schmidt-Thomé J. (1958). Gewinnung von 20 β -Hydroxysteroiden aus 17 α -21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden durch mikrobiologische Hydrierung mit *Streptomyces hydrogerans*. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie**. 313;1:117-123
- Lipski A, Altendorf K. (1995) *Actinomadura nitritigenes* sp. nov., Isolated from Experimental Biofilters. **Int. J. Syst. Bac.** 45;4, 717-723.
- Maheswari MU, Chandra TS. (2000). Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. **World journal of microbiology and biotechnology**. 16:3; 257 – 263.
- Miller JJ, Liljeroth E, Keinken G, Veen JAV, (1990) Fluctuations in the fluorescent *Pseudomonas* and actinomycete populations of rhizosphere and rhizoplane during the growth of spring wheat. **Can. J. Microbiol.** 36: 254 – 258.
- Molla AH, Shamsuddin ZH, Halimi MS, Morziah M, Puteh AB (2001) Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. **Soil Biol Biochem** 33:457–463

- Nakaew N, Rangjaroen C, Sungthong R, (2015) Utilization of rhizospheric *Streptomyces* for biological control of *Rigidoporus* sp. causing white root disease in rubber tree. **Eur. J. Plant. Pathol.** 142: 93 – 105.
- Narayanasamy P. (2013). Detection and Identification of Bacterial Biological Control Agents, em **Biological Management of Diseases of Crops.** 201 – 293.
- Nimaichand S, Devi MA, Tamreihao K, Ningthoujam DS, Li WJ. (2015). Actinobacterial diversity in limestone deposit sites in Hundung, Manipur (India) and their antimicrobial activities. **Front. Microbiol.** 6:413 10.3389/fmicb.2015.00413
- Nwagu T, Amadi OC. (2013). Amylolytic, lipolytic and proteolytic activity of *Kocuria varians* isolated from fermented African oil bean seed (*Pentaclethra macrophylla*). **Scientific Journal of Microbiology.** 2;3, 65-73.
- Palaniyandi SA, Yang SH, Suh JW. (2013). Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. **Journal of applied microbiology.** 115:1; 207 – 217.
- Qin S, Xing K, Jiang JH, Xu LH, Li WJ, (2011). Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 89 457–473.
- Rajput Y, Biswas J, Rai V, (2012) Potential test in antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of subterranean *Streptomyces* strains isolated from kotumsar cave of India. **International journal of biological chemistry.** ISSN 1819-155X. DOI 10.3923/ijbc.2012.
- Rashad FM, Fathy HM, El-Zayat AS, Elghonaimy AM (2015) Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments. **Egypt. Microbiol. Res.** 175: 34–47.

- Rebets Y, Ostash B, Luzhetskyy A., Hoffmeister D, Brana A, Mendez C, Salas JA, Bechthold A., Fedorenko V., (2003). Production of landomycins in *Streptomyces globisporus* 1912 and *S. cyanogenus* S136 is regulated by genes encoding putative transcriptional activators. **FEMS Microbiology Letters** .222 ;149-153.
- Rhijn PV, Vanderleyden J, (March 1995). The Rhizobiumplant symbiosis. **Microbiological Reviews** 124–142.
- Shrivastava P, Kumar R, Yandigeri MS. (2017). In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Saudi J. of Biological Sciences**, 24, 192–199.
- Siddikee MA, Chauhan PS, Anandham R, Han GH, Sa T, (2010) Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. **J Microbiol Biotechnol** 20;11:1577–1584.
- Singh V, Haque S, Singh H, Verma J, Vibha K, Singh R, Jawed A, Tripathi CKM, (2016) Isolation, screening and identification of novel isolates of actinomycetes from India for antimicrobial applications. **Front. Microbiol.** 7:1921.
- Solanki MK, Singh RK, Srivastava S, Kumar S, Kashyap PL, Srivastava AK, Arora DK, (2014) Isolation and characterization of siderophore producing antagonistic rhizobacteria against *Rhizoctonia solani*. **J. Basic Microbiol.** 54:6;585–597.
- Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A, (2012) Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. **Cent. Eur. J. Biol.** 7:3; 373 – 390.
- Sugiyama A, Ueda Y, Takase H, Yazaki K (2014) Pyrosequencing assessment of rhizosphere fungal communities from a soybean field. **Can J Microbiol** 60:687–690
- Takizawa M, Colwell RR, Hill RT (1993) Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake bay. **Appl. And Environ. Microbiolo.** 59: 997- 1002.

- Thaning C, Welch CJ, Borowicks JJ, Hedman R, Gerhardson B (2001) Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* apothecial formation by the soil bacterium *Serratia plymuthica*: identification of a chlorinated macrolide as one of the causal agents. **Soil Biol. Bioch.** 33:1817 – 1826.
- Terekhova LP, Galatenko OA, Kuliaeva VV, Tolstykh IV, Golova TP, Katrukha GS, Zhukhmistova NE, Olkhovatova OL, Malkina ND, Boikova LuV.(1992) Production of griseoviridin and etamycin by the new culture, *Streptomyces albolongus*. **Antibiot Khimioter.** 37:12;19-21.
- Tsavkelova EA, Klimova SY, Cherdyntseva TA, Netrusov AI (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Appl Biochem Microbiol** 42: 117–126.
- Vineeta Singh V, Haque S, Singh H, Verma , Vibha K, Singh R, Jawed A., Tripathi CKM. (2016) Isolation, Screening and Identification of Novel Isolates of Actinomycetes from India for Antimicrobial Applications. **Front. Microbiol.** 7:1921.
- Wallace KK, Payne GF, Speedie MK (1990). Ammonium effects on streptonigrin biosynthesis by *Streptomyces flocculus*. **Journal of Industrial Microbiology**, 6 :43-48.
- Xu J, Wang Y, Xie SJ, Xu J, Xiao J, Ruan JS, (2009). *Streptomyces xiamensis* sp. nov., isolated from mangrove sediment. **Intl j Sist Evo Mic.** 59; 472 – 476.
- Xu W, Zhang D, Si C, Tao L, (2013). Antifungal macrolides from *Streptomyces cavourensis* YY01-17. **Chemistry of Natural Compounds.** 49: 5; 988-989.
- Zhang Q, Yong D, Zhang Y, Shi X, Li B, Li G, Liang W, Wang C, (2016) *Streptomyces rochei* A-1 induces resistance and defense-related responses against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit during storage. **Postharvest Biology and Technology**, 115;30-37.
- Zheng D, Ding N, Jiang Y, Zhang J, Ma J, Chen X, Liu J, Han L, Huang X, (2016). Albaflavenoid, a new tricyclic sesquiterpenoid from *Streptomyces violascens*. The journal of antibiotics: doi:10.1038/já.2016.12
- Zhu ZB, Lv WJ, Ji ZL, Tong YH, (2008) Isolation of biocontrol actinomycetes in soil and their inhibitory effects on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Xiandai Nonngye Keji.** 12:106 – 108.

4. SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM SOJA POR ACTINOBACTÉRIA DO CERRADO

Resumo

Diferentes estudos têm sido conduzidos para pesquisar o potencial de actinobactérias como fonte de matéria prima na descoberta de novos produtos. Além disso, estes Microrganismos desenvolvem um importante papel na ciclagem de nutrientes e disponibilização destes para as plantas. A linhagem 3AS4, identificada como pertencente ao gênero *Streptomyces* a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA, foi selecionada devido ao potencial de solubilizar fósforo. O objetivo desse trabalho foi investigar o possível mecanismo de ação envolvido na solubilização de fósforo e estimulação de crescimento vegetal por parte desta linhagem de actinobactéria. Para identificar o possível mecanismo de ação, um extrato aquoso de 12 dias foi examinado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Experimento em condições de casa de vegetação foi realizado a fim de avaliar o potencial de promoção de crescimento em plantas de soja. Além do solo sem adição de fosforo, foram testadas duas fontes de adubo comercial; Fosfato de Rocha Bayovar (PR) e Super Fosfato Triplo (SPT). Vasos com e sem inoculação da linhagem 3AS4 foram comparados em tratamentos com adição de fosforo nas concentrações de 0 e 40 kg ha⁻¹. Os parâmetros altura, peso seco da biomassa da raiz e parte aérea foram coletados para verificar a eficiência da inoculação da 3AS4 comparado ao controle. O extrato aquoso apresentou perfil cromatográfico similar quando comparado com o padrão do ácido glucônico. Diferenças na altura das plantas foram observadas após 6 semanas quando inoculadas com a 3AS4. A relação Parte aérea/Raiz foi significativamente maior quando adicionado o fósforo junto com a actinobactéria. Plantas sem adição de fósforo e com a 3AS4 evidenciaram desenvolvimento similar na Parte aérea/Raiz quando comparadas com plantas inoculadas com 40 kg ha⁻¹ de PR e SPT. Esses resultados sugerem que o uso da actinobactéria 3AS4 poderia ser um importante recurso para a agricultura sustentável mediante a redução de uso de adubo fosfatado.

Palavras-chave: Cromatografia líquida de alta resolução, *Streptomyces*, Ácidos orgânicos, Casa de vegetação

Abstract

Several studies are being conducted to research the potential of actinobacteria as source of raw material for new products discovery. Furthermore, these microorganisms develop an important role in nutrient cycling making and availability to plants. The isolate 3AS4, identified as belonging to genus *Streptomyces* from 16S rRNA sequencing, was selected due to its phosphorus solubilization ability. This objective of this work was to investigate the mechanism of action involved in phosphorus solubilization and plant growth promotion potential of this actinobacteria lineage. To recognize its mechanism of action, 12 days crude extract was monitored with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). A greenhouse experiment was carried out to evaluate the potential plant growth promotion of the isolate in soybean. Besides the soil with no phosphorous, two phosphate sources, Rock Phosphate Bayovar (RP) and Triple Super Phosphate (SPT) were added at the soil. Pots with and without inoculation of 3AS4 were compared in phosphorus addition of 0 and 40 kg ha⁻¹. Plants attributes height, dry shoot and root biomass

weight were evaluated to verify the efficiency of 3AS4 inoculation compared to control pots. The crude extract presented a chromatographic profile similar to gluconic acid. Significant differences in plant height were observed at 6 weeks when inoculated with the isolate. The Shoot/Root index was significantly higher when applied the higher dose of PR and SPT along with 3AS4 isolate. When inoculated with the isolate, the plants with non-additional phosphorous showed similar Shoot/Root development compared to the control pots with 40 Kg/h of TSP and RPB. These results suggest that Actinobacteria might be a valuable resource for sustainable agriculture application by reducing phosphate fertilization.

Keywords: High resolution liquid chromatography, Streptomyces, Organic acids, Greenhouse

4.1. Introdução

O cerrado é considerado o segundo maior bioma brasileiro, ocupando uma área de 203,4 milhões de hectares, o que equivale a aproximadamente 24% do território nacional (Andrade et al., 2016). Apesar de parecer um ambiente pobre, este bioma apresenta grande riqueza de espécies, recursos genéticos e ecossistemas (Sawyer, 2002).

Devido à enorme diversidade biológica encontrada no cerrado, este bioma é uma importante fonte de agentes biológicos economicamente interessantes, já tem sido descrito como fonte de matéria prima para a descoberta de medicamentos, como produtos naturais e análogos, agentes antifúngicos, antitumorais e antibióticos, produzidos por plantas e microrganismos (Barreiro e Bolzani, 2009).

Até a década de 1970 o solo do cerrado foi considerado impróprio para a agricultura, porém, devido ao avanço tecnológico e a utilização de fertilizantes químicos, tornou-se possível a expansão agrícola para a essa região (Santos et al., 2014). Desta forma, atualmente na região centro oeste do Brasil encontra-se a maior densidade de cultivo de soja do país, sendo favorecida por fatores como a topografia, a adequada profundidade do solo para uso de maquinaria mecanizada, pluviometria e luminosidade. No entanto, o solo dessa região apresenta baixo pH, alta capacidade de fixação de fósforo e, conseqüentemente baixa disponibilidade desse nutriente para as culturas (Hinsinger, 2001). Apesar de a correção de tais características através da fertilização química ter apresentado resultados satisfatórios para o desenvolvimento da cultura neste ambiente, o alto potencial de fixação de fósforo nesse solo causa significativas perdas econômicas, pois grande parte dos fertilizantes fosfatados adicionados ao solo torna-se rapidamente inacessíveis.

A cultura de soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das principais culturas de grãos do Brasil (Arruda, 2012), e também a que mais necessita de fertilização fosfatada, consumindo cerca de 1.459.726 toneladas de Fósforo (Cunha et al, 2010). Em 2017 a produção nacional chegou a ser de 107 mil toneladas, posicionando o Brasil como o segundo maior produtor mundial, ficando atrás apenas dos Estados unidos (120 mil toneladas) (CONAB 2017). A principal importância deste cultivo se deve ao alto conteúdo de proteína no grão, próximo de

40% (Vello e Silva, 2006) o que o posiciona como uma matéria prima de grande importância para indústria de alimentação humana e animal.

A mobilização do fosfato fixado no solo por meio da ação de Microrganismos tem sido amplamente explorada como alternativa ao aumento da fertilização fosfatada (Richardson et al., 2009). Neste contexto, o filo Actinobactéria, que é amplamente distribuído na natureza está envolvido em diversos processos biológicos, apresentando ampla variedade de compostos bioativos produzidos e diversidade funcional, tais como: produção de quitinase (Gomes et al., 2000), celulase (Lima et al., 2005), fito hormônios (Shivastava et al., 2008), agentes antitumorais (Cragg et al., 2005), substâncias que estimulam o crescimento vegetal (Riedlinger et al., 2006), interação benéfica com outras Rizobactérias (Gregor et al., 2003). Esse filo também tem sido explorado quanto ao seu papel na promoção de crescimento de plantas devido à solubilização de fosfatos no solo (Hamdali et al., 2008a, Hamdali et al., 2008b).

Microrganismos pertencentes a este filo, possuem complexos mecanismos biosintéticos que os favorecem na adaptação em diferentes ecossistemas e lhes proporcionam vantagens para aperfeiçoar a produção de compostos biologicamente ativos (Solecka et al., 2012). Por meio desse trabalho, foi possível acessar Actinobactérias do bioma Cerrado e avaliar o seu potencial de solubilização de fósforo, investigando os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse processo, além de verificar o potencial de promoção do crescimento de plantas da soja em casa de vegetação.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Locais de Amostragem

Foram realizadas duas amostragens de solo rizosférico de plantas de Trigo (*Triticum aestivum*, L) o primeiro local de coleta, pertence ao estado de São Paulo, município de Palmital (S 22° 47' 30''; W 50° 12' 18''), sendo realizada em Julho de 2014. A segunda coleta foi realizada em Agosto do mesmo ano no município de Planaltina, localizado em Brasília, DF (S 15° 36'; W 47° 42').

4.2.2. Isolamento e purificação

Para isolamento de Actinobactérias do solo e rizosfera, cerca de 1 g de solo foi pesado e transferido para tubos de ensaio contendo nove ml de solução salina (0,85% Na Cl), mantidos por 10 minutos em agitador Vortex e por 20 segundos em ultrassom (Ultracleaner 1400A), a fim de promover a liberação e homogeneização da solução. Após o período de homogeneização foram realizadas diluições seriadas até 10⁻⁴, seguida da retirada de alíquotas de 0,1 ml das duas últimas diluições que foram plaqueadas em meio de cultivo ISP2 (Shirling e Gottlieb,1966). As colônias obtidas após o isolamento foram purificadas pela técnica de inoculação por esgotamento em meio sólido ISP2, visando a obtenção de colônias isoladas. A fim de determinar as características de crescimento do isolado, o mesmo foi cultivado nos meios do *International Streptomyces Project* (ISP) segundo, Shirling e Gottlieb (1966), a 28°C por duas semanas. A sensibilidade a antibióticos, tolerância a pH e NaCl, assim como a diferentes temperaturas foram testados em meio GY. A assimilação de várias fontes de carbono e a degradação de compostos foi verificada utilizando-se meio de cultura basal e GY, respectivamente (Gordon e Mihm 1962).

4.2.3. Caracterização molecular

O isolados obtidos foram reativados em placas contendo o meio de cultivo ISP2 (Shirling e Gottlieb,1966), para checagem da pureza da colônia e posteriormente repicado em tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo glicose-extrato de levedura (GY) (Gordon e Mihm, 1962), seguindo-se de incubação por 72 h a 28°C e 150 rpm. A biomassa centrifugada foi usada posteriormente para extração do DNA usando o kit Ultra Clean® Microbial DNA Isolation MO Bio, de acordo com especificações do fabricante. A amplificação do gene que codifica para o gene rRNA 16S foi realizada utilizando os iniciadores universais 27F e 1492R. A purificação dos produtos de PCR foi feita utilizando o kit de purificação Promega Wizard SV gel and PCR clean-up system – Ref A9282. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior sequenciamento dos fragmentos de interesse foram feitos usando o kit de sequenciamento BIGDYE (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Os iniciadores utilizados foram: 27F, 704F, 1114R e 1492R. O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador 3500 Sanger Genomic Analyzer

(Applied Biosystems, Foster City, Calif). As sequências foram comparadas com sequências de linhagens tipo utilizando o servidor EzTaxón-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 e Nei, 1987), através do programa MEGA 7 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura, 2013).

4.2.4. Capacidade de solubilização de Fósforo e produção de ácidos orgânicos

Os isolados de actinobactéria foram avaliados na sua capacidade de mobilizar diferentes fontes de fósforos, Para isto, foram utilizados os meios NBRIP (em inglês National Botanical Research Institute's Phosphate; Nautiyal, 1999), PSM (Phytate Specific Media; Singh et al., 2013), e NBRIP modificado contendo fosfato de rocha; PR (Gadalgí e Sá, 2002).

Para quantificar a quantidade de fosfato liberado de cada meio, foi inoculado 1 mL de suspensão de esporos em concentração de 1×10^8 ufc ($OD_{560}=0.5$; MARRA et al 2011) e posteriormente incubados a 25°C sob agitação (140rpm), medidas de pH e alíquotas para quantificação do fósforo liberado foram feitas nos dias 0,2,4,6,8 e 12. As amostras foram centrifugadas (15000g) durante 5 minutos, a quantidade de fósforo no sobrenadante foi quantificado usando o método de fosfomolibdenium (Murphy e Riley, 1962), outra parte do sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® 0,02 µm e aplicado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para verificar e identificar a produção de ácidos orgânicos, para isto, foi utilizada uma coluna Aminex HPX 87H – 300 x 7.8 mm (125-0140 Bio Rad) usando como fase móvel Água: Ácido sulfúrico 0.005 M, com uma vazão de 0.4 mL/min, a temperatura do forno de 50°C e 20 µL volume de injeção. As amostras foram analisadas no comprimento de onda de 210 nm. Foram realizadas curvas com os padrões de ácidos orgânicos: Oxálico, Cítrico, Glucônico, Cetoglucônico, Malônico, Succínico, Lático, Fórmico, Málico e Propiônico.

4.2.5. Ensaio em casa de vegetação

O solo utilizado para o experimento em casa de vegetação foi obtido no campo experimental de Embrapa - Meio Ambiente localizado em Jaguariúna SP, sem histórico de uso de fertilizante e pobre em fósforo (Tabela 3).

Tabela 3. Propriedades químicas do solo utilizado para os experimentos em condições de casa de vegetação.

pH (CaCl ₂)	MO (g dm ⁻³)	P _{resina} (mg dm ⁻³)	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V %
-----mmole dm ⁻³ -----									
5,3	22	5	34	1,3	14	12	27,3	61,3	45

Plantas de soja foram mantidas em condições de casa de vegetação ($\pm 35^{\circ}\text{C}$) com luminosidade natural e irrigação controlada (70% da capacidade de campo). Foram avaliadas duas fontes de fósforo; fosfato de rocha bayovar (PR) (31% P₂O₅) e Super fosfato triple (SPT) (18% P₂O₅) duas doses (0 e 40 kg.ha⁻¹ P₂O₅), Para isto, foram semeadas cinco sementes da cultivar “Potencia” (90% germinação – Instituto Agrônômico de Campinas) em vasos de 400 g. Sete dias depois, foi feito o desbaste, até deixar três plantas por vaso, e inoculada a actinobactéria 3AS4. O inoculo foi obtido em meio Batata Dextrose (BD) mantido em agitação 135 rpm a 28 °C, 3 mL de uma suspensão de esporos (1x10⁸) foi aplicada próxima a cada planta. O tempo de crescimento foi de seis semanas, sendo avaliadas às seguintes variáveis: altura das plantas, massa seca de raiz e de parte aérea. A porcentagem do efeito de cada tratamento foi calculada de acordo com a fórmula descrita por Henri et al., (2014), (Formula 1) considerando o controle negativo o tratamento sem adição de fósforo e sem inoculação da actinobactéria.

Formula 1.

$$Efeito (\%) = \frac{Tratamento - (Controle Negativo)}{Controle Negativo} \times 100$$

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Avaliação fenotípica e fisiológica do isolado 3AS4

O isolado 3AS4 apresentou características morfológicas e fisiológicas consistentes com o gênero *Streptomyces* (Kämpfer 2012) (Tabela 4).

Tabela 4. Características fenotípicas e fisiológicas do isolado 3AS4, (+); positivo, (-); negativo

Característica	Isolado 3AS4	Característica	Isolado 3AS4	Característica	Isolado 3AS4
pH		Utilização fonte carbono		Teste de Degradação	
4	+	Adenina	-	Tirosina	+
5	+	Amido	+	Tween 20	+
8	+	Caseína	+	Tween 80	+
10	+	Celobiose	-	Xantina	-
Temperatura		D-Arabinose	+	Xylano	+
16	+	D-Galactose	+	Xylose	+
28	+	D-Maltose	-	ISP	
37	+	D-Manose	+	3	+
40	-	D-Ribose	-	4	+
NaCl (%)		Glicose	+	6	+
5	+	Guanina	+	micelio	amarelo
10	+	Hypoxantina	+	micelio aereo	-
15	+	L-Rafinose	+	Pigmentos difusíveis	-
Sensibilidade a Antibióticos (ug.mL⁻¹)		L-Rhamnose	+	Meios de cultivo	
Rifampicina (10)	+	Manitol	+	BDA	+
Estreptomicyna (16)	+	Meso inositol	+	Czapeck	+
Ampicilina (10)	+	Sacarose	+	GY	+
Eritromicina (15)	-			Nutri Agar	+

4.3.2. Filogenia do isolado 3AS4 (*Streptomyces rishiriensis*)

Os dados do sequenciamento rRNA 16s suportaram a atribuição do isolamento 3AS4 ao gênero *Streptomyces* e espécie *rishiriensis* (*Streptomyces rishiriensis* NBRC 13407^T) com 99,03% de similaridade (Figura 10), o que coincide com o descrito previamente por Charousová et al., (2015) onde se destacou a produção de pigmentos difusíveis no meio, taxa de crescimento baixa e não produção de micélio aéreo e esporos por parte de isolados deste gênero.

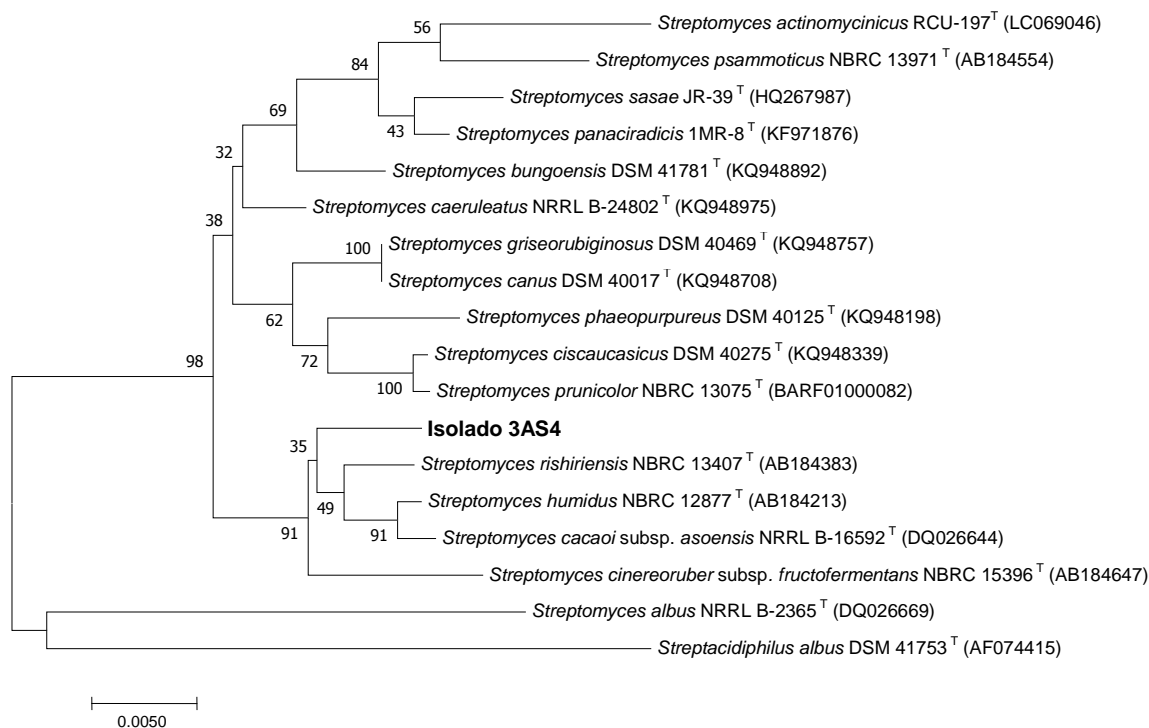


Figura 10. Relações filogenéticas entre o isolado 3AS4 e as linhagens tipo do gênero *Streptomyces* mais próximos baseado no método evolutivo de Neighbour-Joining. A árvore consenso foi inferida com bootstrap para 1.000 réplicas. Como outgroup foi utilizado à linhagem *Streptacidiphilus albus* DSM 41753^T.

4.3.3. Solubilização de fosforo

Do isolamento, 16 actinobactérias foram isoladas a partir de rizosfera de trigo (dado não mostrado). A triagem para confirmar a capacidade de mobilização de fósforo mostrou que 3 isolados foram capazes de mineralizar fitato, porém, apenas o isolado identificado como 3AS4 demonstrou capacidade de solubilizar além do fitato, o fosfato de cálcio e de rocha, conforme apresentado na Tabela 5 e Figura 11.

Estudos prévios relataram uma alta prevalência de actinobactérias em solos do bioma Cerrado (Silva et al 2013.). Esses solos majoritariamente ácidos têm pouca disponibilidade de macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) e micronutrientes (Boro, Cobre, Molibdênio e Zinco). Além disso, eles geralmente mostram alta saturação de alumínio e potencial de fixação de P (Lopes 1996). A presença de bactérias mobilizadoras de

fosfato na rizosfera pode permitir maior disponibilidade de fósforo para plantas, devido as possíveis associações benéficas estabelecidas por estes organismos. Desta forma, a busca por possíveis bioinoculantes neste micro-habitat pode favorecer as associações com a soja cultivada em solos com características com as encontradas no cerrado.

Os solos mostram grande variação de pH entre outras características, portanto, não existe um composto de fosfato capaz de “selecionar” os melhores Microrganismos mobilizadores. Por isso, recomenda-se avaliar mais do que uma fonte de fosfato para realizar a triagem dos melhores Microrganismos, incluindo fosfatos orgânicos e fosfato de rocha (Bashan et al., 2013).

Tabela 5. Avaliação da capacidade de mobilização de diferentes fontes de fósforo por parte de três isolados de actinobactéria.

Actinobactéria	Mobilização de Fósforo		
	Fosfato de Rocha	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fitato
3 AS 4	+	+	+
2 BS 5	-	-	+
3 BS 2	-	-	+

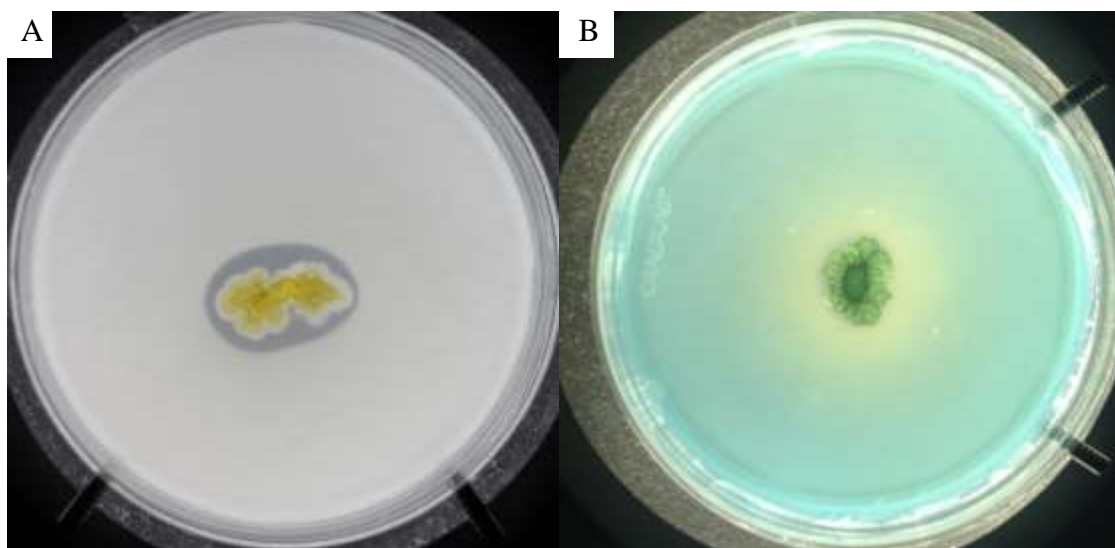


Figura 11. Hidrolise de fosforo por parte do isolado 3AS4 usando dois meios de cultivo diferentes, crescido a 28°C durante 2 semanas. A; Meio NBRIP, B: Fosfato de Rocha

Além disso, a capacidade dos microrganismos em mobilizar fosfato geralmente é complementada com a capacidade de produzir ácido indolacético (AIA) que também promovem o crescimento da planta (Fialho oliveira et al., 2010; Shrivastava et al., 2017). A produção de sideróforos pelos microrganismos, também é um mecanismo para a mobilização de fosfato, formando complexos estáveis com fósforo a partir de alumínio, ferro e compostos de cálcio (Watteau e Berthelin, 1994; Welch et al., 2002).

4.3.4. Quantificação do Fosforo solubilizado

Os meios de cultivo líquidos suplementados com fosfato de cálcio e fosfato de rocha mostraram diminuição do pH ao longo do tempo (Figura 12a), isso pode indicar que a atividade de solubilização ocorreu provavelmente devido à liberação de ácidos orgânicos pelos microrganismos, do que a excreção de sideróforos.

A liberação de fosfato foi quantificada desde o dia dois até o dia 12, porém, a maior quantidade de fosfato foi liberada do fosfato de cálcio (Figura 12b). A quantidade de fosfato liberado no meio suplementado com fitato foi de 150 a 410 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, no meio de fosfato de cálcio foi de 190 a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e no meio com fosfato de rocha de 170 a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no dia dois e 12 respectivamente. Estudos prévios relataram liberação de fosfato de em meio contendo fosfato de rocha de 8,34 a 29,67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por isolados de *Streptomyces* sp. (Hamdali et al., 2008a), esses resultados demonstram o grande potencial de solubilização de fosforo por parte da linhagem 3AS4 (*Streptomyces rishiriensis*)

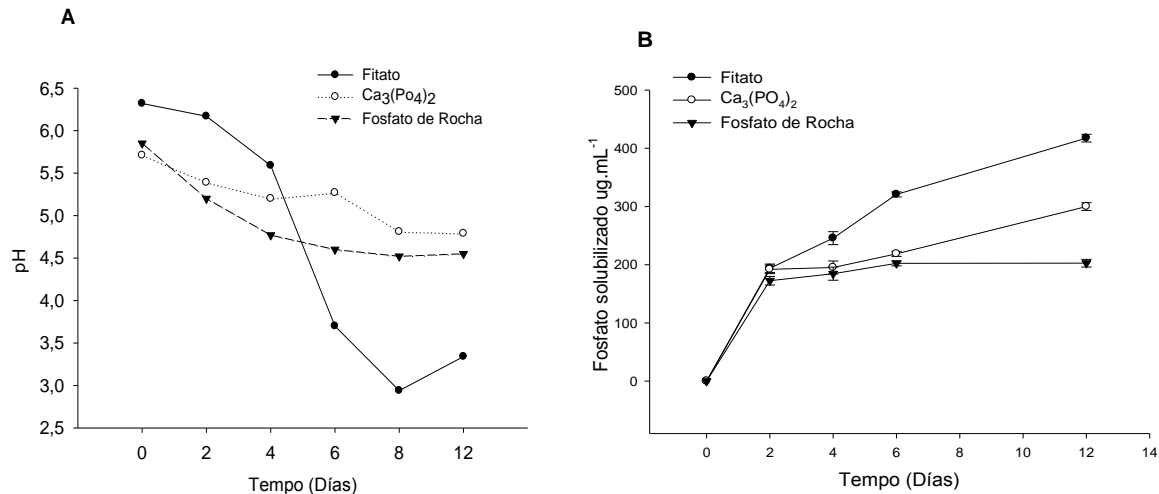
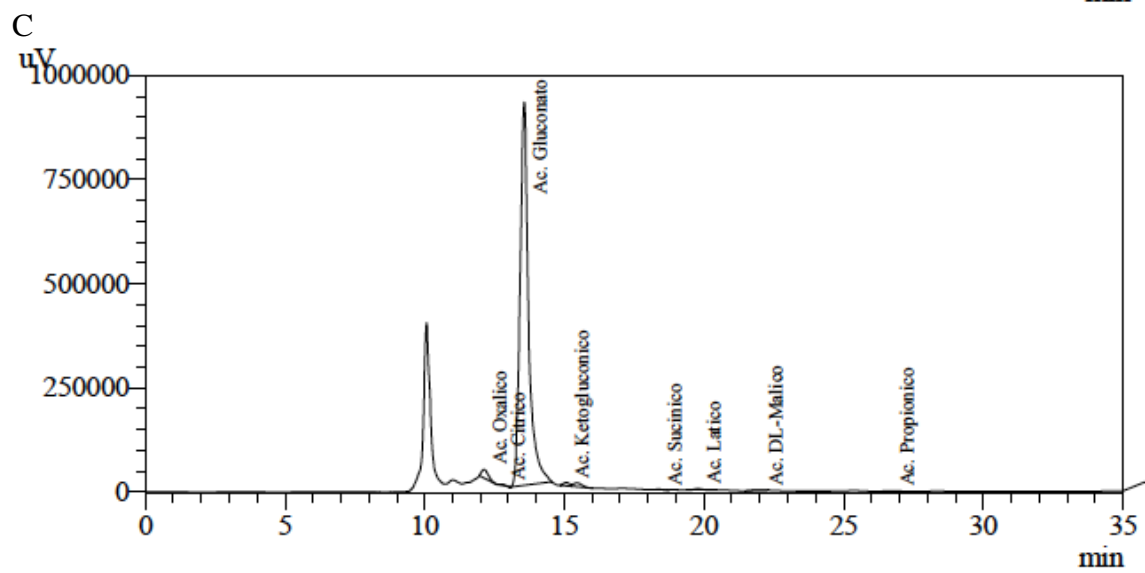
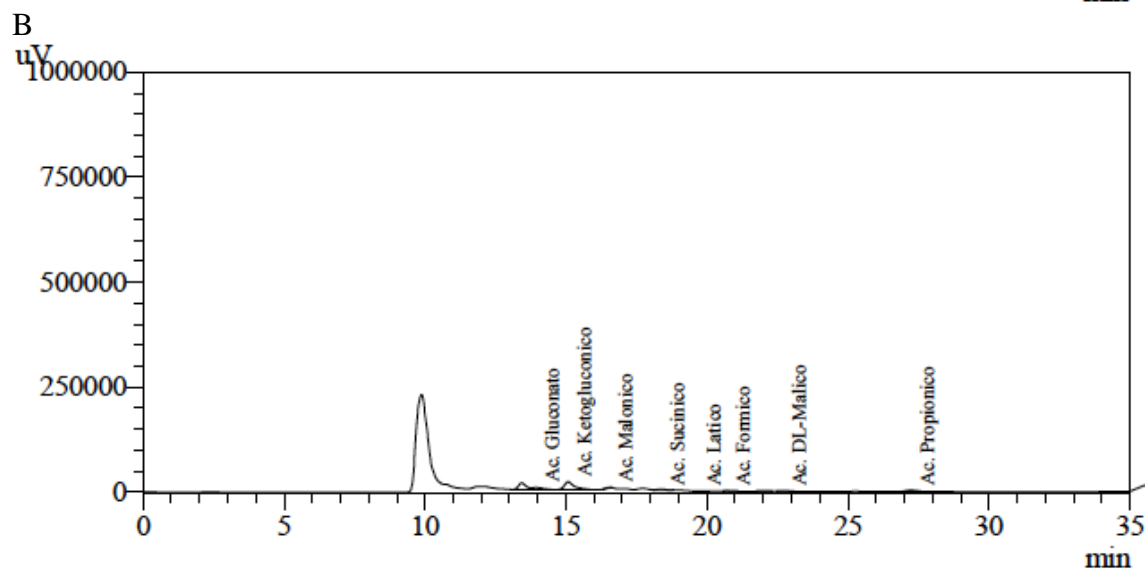
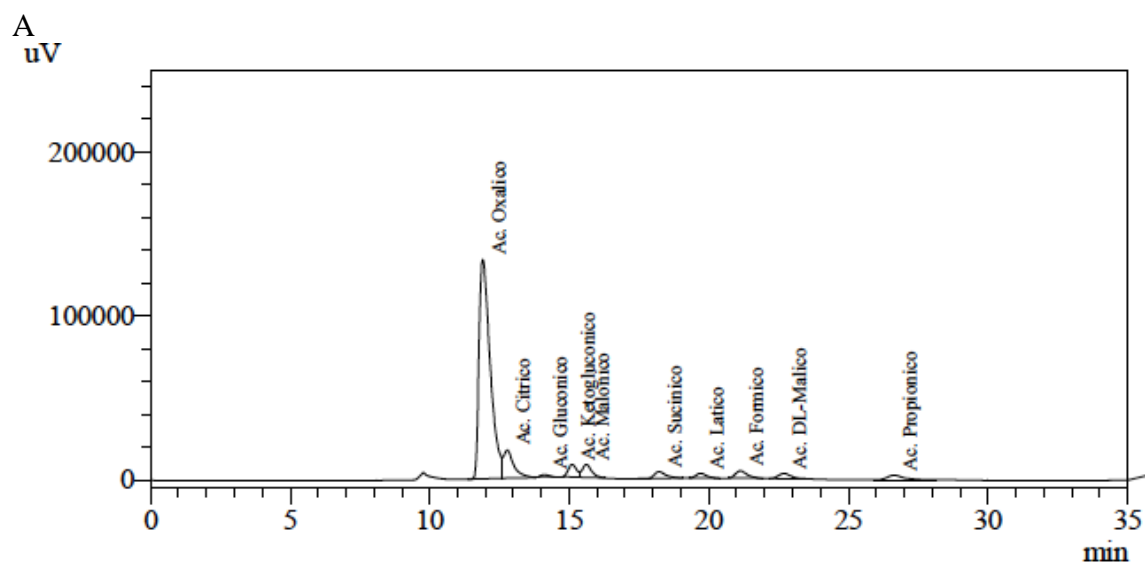


Figura 12. Análise do comportamento de pH (A) e mobilização de fósforo (B) em três meios diferentes (Fitato, Ca₃(PO₄)₂ - Fosfato de cálcio e Fosfato de Rocha) inoculados com a isolado 3AS4, crescido durante 12 dias a 28°C sob agitação.

4.3.5. Análise por Cromatografia líquida

A avaliação em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) mostrou perfil cromatográfico semelhante entre o padrão de ácido glucônico e extrato aquoso do isolado 3AS4 após 12 dias de incubação (Figura 13). O isolado 3AS4 apresentou grande habilidade para solubilizar fosfato de cálcio e fosfato de rocha, além de mineralizar o fitato. Desta forma, o isolado identificado como 3AS4 foi selecionado para fazer a identificação molecular e realizar ensaios em condições de casa de vegetação. Estudos recentes (Jog et al., 2014) tem demonstrado a presença de ácido glucônico em extratos de *Streptomyces* sp. com capacidade de estimular crescimento em plantas.



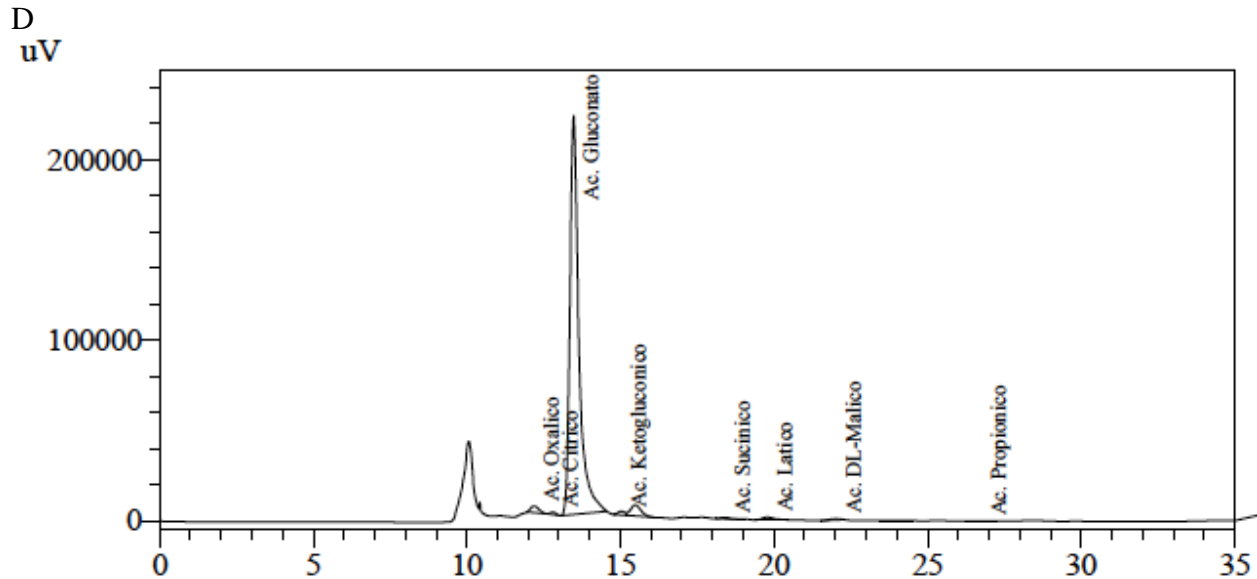


Figura 13. Análise por HPLC de ácidos Orgânicos envolvidos na solubilização de Fosforo, A: Perfil cromatográfico dos padrões de ácidos orgânicos. B; Extrato do isolado 3AS4 *S. rishiriensis* em meio com Fitato, C; Extrato do isolado 3AS4 *S. rishiriensis* em meio de Fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), D; Extrato do isolado 3AS4 *S. rishiriensis* em meio de Fosfato de Rocha. Todos os extratos foram obtidos após 12 dias de crescimento em meio líquido sob agitação (140 rpm) a 28°C.

4.3.6. Ensaio em casa de vegetação

A cultura da soja necessita de uma grande quantidade de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Para suprir a demanda por nitrogênio, desde 1960, quando a soja passou a ser produzida em escala comercial no Brasil, foram adotadas medidas enfatizando a fixação biológica de nitrogênio. Atualmente, a cultura de soja obtém todo o nitrogênio necessário para sua produção a partir da fixação biológica (Hungria e Vargas, 2000), que foi obtido a partir da seleção de rizóbios para formulação de inoculantes e seleção de plantas com predisposição para nodulação.

O segundo nutriente que limita a produção de soja é o fósforo. No Brasil, a cultura da soja é a responsável pelo maior uso de fertilizantes fosfatados no solo (Cunha 2010). O fósforo é fortemente fixado em coloides em solos ácidos tropicais, de forma que menos de 0.1% do fósforo encontra-se na sua forma solúvel (Novais e Smith 1999). Assim como para o nitrogênio,

a aplicação de inoculantes baseados em Microrganismos capazes de liberar o fósforo fixado no solo tem grande potencial para aumentar a disponibilidade de nutrientes para a agricultura.

O isolado apresentado nesse trabalho se mostrou bom solubilizador e mineralizador de fósforo em *in vitro*. Para verificar a atividade deste Microrganismo e sua relação com as plantas, foi realizado um ensaio em casa de vegetação como descrito anteriormente. Nesse ensaio, observou-se que a inoculação do isolado 3AS4 em solo sem adição de fósforo promoveu um aumento no crescimento de 17%, em relação às plantas controle (Tabela 6).

Uma das estratégias para reduzir a fixação de fósforo no solo seria a utilização de fontes de fósforo menos solúveis. A aplicação de fosfatos de rocha apresenta diversas vantagens quando comparado com a aplicação de outros fertilizantes fosfatados. Por não necessitarem passar pelo processo químico que leva a produção de fertilizantes convencionais, as rochas fosfáticas geralmente apresentam menor custo no mercado, além de redução dos impactos causados pelo processo industrial (FAO 2004). Devido a sua composição química extremamente variável e complexa, eles são fontes de diversos nutrientes, além do fósforo (FAO 2004). Além disso, a liberação lenta dos nutrientes da rocha para o solo provê as necessidades das culturas agrícolas reduz a taxa de fixação do fósforo. No entanto, um dos principais problemas da utilização de fosfatos de rocha como fonte de nutrientes é que nos primeiros anos, a produção tende a ser menor comparada a culturas que receberam fosfatos solúveis (Horowitz e Meurer, 2004).

Quando o isolado 3AS4 foi inoculado juntamente com uma fonte de fósforo insolúvel (RP), o crescimento da parte aérea da planta foi quase 80% maior que as plantas que cresceram em condições limitantes de fósforo (Tabela 6). A relação parte aérea: raiz, foi cerca de 30% maior quando o fosfato de rocha foi adicionado juntamente com o isolado do que quando foi utilizado apenas o fosfato (Figura 14 e 15). Além da solubilização do fósforo, esse microrganismo produz e libera ácido indolacético, contribuindo com a estimulação do crescimento da planta (Tabela 5 e Figura 15).

Tabela 6. Efeito (%) dos diferentes tratamentos avaliados na altura e massa seca da parte aérea e raiz das plantas de soja seis semanas após o isolado 3AS4 (*S. rishiriensis*) com diferentes fontes de fósforo, PR: Fosfato de rocha bayovar, SPT: Super fosfato simples a 40 kg.ha⁻¹.

Tratamento	Altura	Parte aérea/Raiz
Controle + 3AS4	17.59±15.07	21.99±7.6
Controle + PR	35.68±5.22	23.71±12.73
Controle + SPT	40.70±12.5	20.36±10.03
3AS4 + PR	77.89±44.4	44.91±8.42
3AS4 + STP	72.86±4.6	32.13±15.96

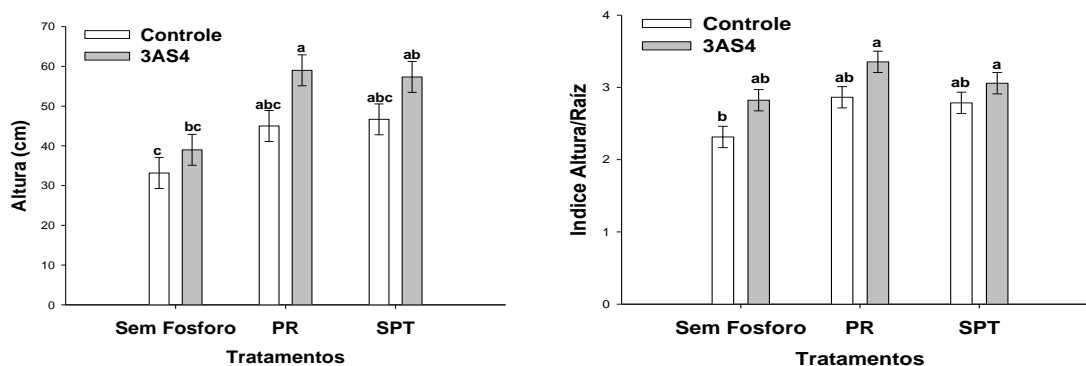


Figura 14. Avaliação da altura das plantas de soja 6 semanas após inoculadas com o isolado 3AS4 (*S. rishiriensis*) com diferentes fontes de fósforo, PR: Fosfato de rocha bayovar, SPT: Super fosfato simples a 40 kg.ha⁻¹.

O desenvolvimento da agricultura sustentável está sendo promovido por práticas que visam o manejo do solo, a engenharia genética de plantas e a aplicação de inoculantes para aumentar a obtenção de nutrientes. A solubilização, mobilização, assimilação e utilização de fósforo é uma das alternativas que tem sido alvo de pesquisas nos últimos anos (Tian et al. 2012; Nesme et al. 2014). A aplicação de inoculantes no solo tem se mostrado ser sustentável e benéfica para o ambiente, em relação a redução da adubação fosfata no solo (Sharma et al. 2013). A inoculação desse Microrganismo juntamente com fosfato de rocha pode ser uma estratégia promissora para promover o crescimento da cultura de forma que se possa minimizar as perdas relativas a adubação com fontes de fósforo solúveis e reduzir a fertilização fosfatada nos solos. No entanto, em muitos estudos, as respostas no crescimento da planta em campo, não refletem os resultados obtidos *in vitro*. A resposta da planta em relação ao Microrganismo inoculado geralmente está relacionada às complexas interações com o solo e a comunidade rizosférica adaptada à planta em questão (Jones e Oburger, 2011).



Figura 15. Avaliação da relação parte aérea: raiz das plantas de soja 6 semanas após inoculadas com o isolado 3AS4 (*S. rishiriensis*) com diferentes fontes de fósforo, PR: Fosfato de rocha bayovar, SPT: Super fosfato simples a 40 kg.ha⁻¹.

Nesse estudo, além dos resultados apresentados *in vitro*, o isolado apresentou um significativo papel na promoção de crescimento cultura de soja, apesar de não haver sido isolada da soja. Isso sugere que o isolado poderia ser capaz de colonizar a rizosfera e ser utilizado em diferentes culturas, no entanto, ainda é necessário aprofundar as pesquisas sobre o papel desse isolado na estrutura da comunidade rizosférica para compreender melhor sua ecologia.

Bactérias do gênero *Streptomyces* constantemente apresentam potencial para produção de substâncias que controlam o crescimento de outros Microrganismos incluindo patógenos de plantas (Law et al., 2017). Esse isolado apresentou atividade quitinolítica, indicando que potencialmente pode ser um controlador de fungos patogênicos. No entanto ainda novos estudos devem ser realizados para verificar sua atividade como biocontrolador em diferentes condições ambientais, bem como desenvolver o melhor método de inoculação para que seu potencial seja completamente explorado.

4.4. Conclusões

- O isolado 3AS4 identificado como *Streptomyces rishiriensis* apresentou importante potencial solubilizador de fósforo tanto orgânico quanto inorgânico o que revela seu potencial de como inoculante para cultura de soja
- *S. rishiriensis* 3AS4, promoveu o crescimento em plantas de soja em 17,59 % quando inoculado no solo e, promoveu em 77,89 e 72,86 % quando inoculado conjuntamente com fosfato de rocha e super fosfato simples respectivamente.
- Foi identificada a produção de ácidos orgânicos por parte da actinobactéria 3AS4, especialmente o ácido glucônico, por tanto, pode se derivar deste o principal mecanismo de solubilização utilizado por este microrganismo.

REFERÊNCIAS

- Andrade RG, Bolfe EL, Victoria DC, Nogueira SF, (2016) Geotecnologia - Recuperação de pastagens no Cerrado. **Agroanalysis** (FGV), 36; 30-33
- Arruda RS, Mesquini RM, Schwan-estrada KRF, Nascimento JF, (2012). Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, 28: 2; 164-172.
- Barreiro EJ, Bolzani, SV, (2009). Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, p. 679-688.
- Bashan Y, Alexander A, De-Bashan K, Luz E, (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and fertility of soils**, v. 49, n. 4, p. 465-479.
- Brzezinska MS, Jankiewicz U, Burkowska A, (2013). Purification and characterization of *Streptomyces albidoflavus* antifungal components. **Applied biochemistry and microbiology**. 49:5;451 – 457
- Charousová I, Javoreková S, Wink J, (2015). Isolation and characterization of *Streptomyces rishiriensis* (VY31) with antibiotic activity against various pathogenic microorganisms. **J micro, biotech and food sci**. 4:1; 23 – 27
- Companhia Nacional de Abastecimento (2017), Acompanhamento da safra brasileira, grãos. Safra 2017/2018, **Segundo levantamento**, Novembro 2017.
- Cragg, GM, Kingstin DGI, Newman DJ, (2005) Anticancer agents from natural products. New York: **CRC**, 2005. 600p
- Cunha JF, Casarín V, Prochnow L, (2010). Balanço de nutrientes na agricultura brasileira. **Informacoes agronomicas**, v. 130, p. 1-11, 2010.
- FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin** ZAPATA, Felipe; ROY, Rabindra N. Use of phosphate rocks for sustainable agriculture, p. 1-148, 2004.

- Fialho de Oliveira M, da Silva MG, Van Der Sand ST, (2010) Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. **Research in Microbiology**. 161; 565 – 572
- Gadalgi RS., Sa T. (2002). New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. **Soil science and plant nutrition**, 48:4; 615-618,
- Gomes RC, Semêdo LTAS, Soares RMA, Alviano CS, Linhares LF, Coelho RRR (2000) Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford. 30:146-150.
- Gordon RE, Mihm JM, (1962) The type species of the genus *Nocardia*. **Journal of General Microbiology**. 27:1;1-10.
- Goulart ACP, Sousa PG, Urashima AS, (2007) Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, 33:4;358-363.
- Gregor AK, Klubek B, Varsa EC, (2003) Identification and use of actinomycetes for enhanced nodulation of soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa. 49;483 – 491.
- Hamdali, H, Bouizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, Virolle MJ, Ouhdouch Y, (2008a) Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied soil ecology**, 38:1;12-19,.
- Hamdali, H, Hafidi M, Virolle MJ, Ouhdouch Y, (2008b) Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24:11; 2565-2575,
- Henri F, Nguesseu NG, Ngo NL, Tchuisseu TGV, Dieudonné N, Etoa FX, (2014) Rock-phosphate solubilising bacteria and their effect on soybean (*Glycine max*) growth under pot grown conditions. **American Journal of Agriculture and Forestry**, 2:4;100-109,

- Hinsinger P, (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and soil**, v. 237, n. 2, p. 173-195.
- Horowitz N, Meurer EJ, (2004) Eficiência agronômica de fosfatos naturais. In: Yamada T, Abdalla SRS, eds. **Fósforo na agricultura brasileira**. 2.ed. Piracicaba, Potafos p. 665-668.
- Hungria M, Vargas MAT, (2000) Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field crops research**, v. 65, n. 2, p. 151-164, 2000.
- Jog R, Pandya M, Nareshkumar G, Rajkumar S. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. **Microbiology** 160 778–788.
- Jones DL, Oburguer E, (2011) Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In: **Phosphorus in Action**. Springer Berlin Heidelberg. 169-198.
- Kämpfer P. (2012). Genus I. *Streptomyces*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W, Whitman WB (eds) **Bergey's manual of systematic bacteriology**, the Actinobacteria, vol 5, 2nd edn. Springer, New York, pp 1455–1462.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J, (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 62; 3, 716-721.
- Law JW-F, Ser H-L, Khan TM, et al. The Potential of *Streptomyces* as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). **Frontiers in Microbiology**. 2017;8:3
- Lima AL, Nascimento RP, Bon EPS, Coelho RRR. (2005) *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**. 37: 272-277.

- Lopes AS, (1996) Soils under Cerrado: a success story in soil management. **Better Crops International**, 10:2;10.
- Marra LM, Oliveira SM, Sousa CRF, Moreira FMS, (2011), Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, 68:5;603-609
- Murphy J, Riley JP, (1962), A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**. 27:31-36.
- Nautiyal CS, (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.
- Nesme T, Colomb T, Hinsinger P, Watson CA, (2014) Soil phosphorus management in organic cropping systems: from current practices to avenues for a more efficient use of P resources. In: **Organic farming, prototype for sustainable agricultures**. 23-45.
- Novais RF, Smyth TJ, (1999) Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: UFV, **DPS**. 399p.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C. (2009), Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and soil**, 321:1; 305-339.
- Riedlinger J, Schrey SD, Tarkka MT, Hampp R, Kapur M, Fiedler HP, (2006) Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain AcH 505. **Applied and Environmental Microbiology**, 72:3550-3557.
- Saitou N, Nei M, (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. 4: 4; 406-425.
- Santos MA, Barbieri AF, Machado CJ, Carvalho JAM, (2014) Minas Gerais e o Marco Inicial da Ocupação do Cerrado Brasileiro: O Papel do Estado. **Redes**, 19:1; 261-275.
- Sawyer D, (2002) População, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no cerrado. In: HOGAN, D. J. et al. (Org.). Migração e ambiente no Centro-Oeste. 279-299.

- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA, (2013), Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, 2:1; 587.
- Shirling EB, Gottlieb D, (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 16, p. 313-340.
- Shrivastava S, Souza SF, Desai PD, (2008), Production of indole-3-acetic acid by enterobacter strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 4855 – 4863.
- Shrivastava P, Kumar R, Yandigeri MS, (2017) In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 24; 192–199.
- Silva MS, Sales AN, Magalhães-Guedes KT, Dias DR, Schwan RF, (2013), Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. **BioMed research international**, 2013:1-10.
- Singh NK, Joshi DK, Gupta RK, (2013) Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters. **Jundishapur Journal of Microbiology**, 6, 5, 2013.
- Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A, (2012) Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. **Cent. Eur. J. Biol.** 7:3; 373 – 390.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. 30:12; 2725-2729.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. 22:22; 4673-4680.
- Tian J, Wang X, Tong Y, Chen X, Liao H, (2012), Bioengineering and management for efficient phosphorus utilization in crops and pastures. **Current Opinion in Biotechnology**, 23:6;866-871.

Vello NA, Silva LAS, (2006). Genética busca atender ao consumo humano crescente. **Visão agrícola**, 3:5; 60-62.

Watteau F, Berthelin J, (1994). Microbial dissolution of iron and aluminium from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids. **Eur. J. Soil Biol.** 30, 1-9.

Welch SA, Taunton AE, Banfield JF, (2002), Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. **Geomicrobiology Journal**, 19:3;343-367.

Yang B, Xue Q, Chen Z, Zhou Y, Zhang X, Xu Y, Gou Z, (2008) Effects of microwave irradiation on isolation of soil actinomycetes. **The journal of applied ecology**. 19:5;1091

5. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS EXTRACELULARES DE ACTINOBACTÉRIAS E POTENCIAL DE CONTROLE DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

Resumo

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um dos principais microrganismos patógenos em culturas de grãos no mundo. Esse fungo apresenta alto grau de patogenicidade para diversos cultivos agrícolas e é considerado uma das principais problemáticas para o cultivo da soja (*Glycine max*), causando o “mofo branco”. O controle biológico de *S. sclerotiorum* tem se mostrado opção para mitigar os danos causados por esse patógeno. Entre os microrganismos utilizados como agentes de biocontrole, as actinobactérias destacam-se por possuírem diversos mecanismos antagonísticos tais como; produção de enzimas extracelulares e metabólitos secundários. Avaliações prévias evidenciaram 55 actinobactérias isoladas de diferentes biomas brasileiros, com atividade antagonística *in vitro* contra o *S. sclerotiorum*. A avaliação da atividade quitinase e glucanase mostrou a capacidade de 29 e 17 isolados, respectivamente, em hidrolisarem quitina e laminarina como única fonte de carbono, sendo três deles; 1AS2a, Caat P5 55 e Caat P8 79 avaliadas quantitativamente. O resultado para a atividade enzimática quitinase (β 1-4 -N- acetilglucosaminidase) foi de 0.03, 0.22 e 0.16 UI respectivamente, entretanto, a atividade glucanase (β 1-3-glucanase) foi 0.23, 0.25 e 0.26 UI respectivamente. Extratos orgânicos das actinobactérias obtidos com diclorometano (26) e acetato de etila (15) demonstraram inibição do crescimento do fungo, se destacando o extrato do isolado 1AS2a que apresentou uma concentração inibitória mínima de 165 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, estudos espectrométricos revelaram a presença de um composto da família das bafilomicinas como principal composto ativo. A anotação do genoma do isolado 1AS2a revelou a presença de 33 operons gênicos envolvidos em vias biossintéticas para produção de compostos antimicrobianos, nos quais um deles, apresentou 100% de similaridade para operon de síntese de bafilomicina, constituída por 8 ORF (Operon Reads Frame) dos quais 5 são policetideos sintases tipo I. Os isolados avaliados mostraram atividades antagonísticas contra *S. sclerotiorum*, como antagonismo e antibiose, as quais, podem reduzir significativamente a quantidade de inoculo viável capaz de produzir o mofo branco, se tornando em novas alternativas de biocontrole em campo.

Palavras-chave: *Streptomyces cavourensis*; Metabólitos secundários; Enzimas hidrolíticas, Mofo Branco, Soja

Abstract

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary is one of the major pathogenic microorganisms in grain crops in the world. This fungus presents a high degree of phytopathogenicity for several agricultural crops and is considered one of the main problems for the soybean crop (*Glycine max*) where it causes "white mold" disease. Biological control of *S. sclerotiorum* has been shown as an option to mitigate the damages caused by this pathogen. Among the microorganisms used as biocontrol agents, actinobacteria stand out because they have several antagonistic mechanisms such extracellular enzymes and secondary metabolites production. Previous evaluations evidenced 55 actinobacteria isolated from different Brazilian biomes, with in vitro antagonistic activity against *S. sclerotiorum*. Chitinase and glucanase enzymatic activity showed that 29 and 17 isolates respectively be able to hydrolyzing chitin and laminarin as the only carbon source, three of them; 1AS2a, Caat P555, and Caat P8 were evaluated quantitatively. The result for enzymatic activity chitinase (β 1-4 -*N*-acetylglucosaminidase) was 0.03, 0.22 and 0.16 IU respectively, however, glucanase activity (β 1-3-glucanase) was 0.23, 0.25 and 0.26 IU respectively. Organic actinobacteria extracts obtained with dichloromethane (26) and ethyl acetate (15) demonstrated inhibition of fungus growth, highlighting the extract of the isolate 1AS2a that presented a minimum inhibitory concentration was 165 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, spectrometric analyses revealed the presence of a compound of the bafilomycins family as the main active compound. The genomic annotation of the 1AS2a isolate revealed the presence of 33 genic clusters involved in biosynthetic pathways for the production of antimicrobial compounds, in which one of them exhibit 100% similarity for the cluster of the bafilomycin synthesis, these cluster consisting of 8 ORF (Operon Reads Frame) of which 5 are type polyketide synthases I. The evaluated isolates showed antagonistic activities against *S. sclerotiorum*, such as antagonism and antibiosis, which can significantly reduce the amount of viable inoculum capable of producing white mold, becoming new biocontrol alternatives in the field.

Keywords: *Streptomyces cavourensis*; Secondary Metabolites; Hydrolytic enzymes; White Mold, Soybean

5.1. Introdução

O mofo branco, causada pelo fungo (Ascomycota) *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma das doenças mais destrutivas para cultivos como soja, feijão, algodão entre outros hospedeiros (Baharlouei et al., 2011), assim como as estruturas de resistência que produz (escleródios) faz deste microrganismo uma ameaça constante no setor agrícola. No Brasil, segundo maior produtor mundial de soja (107 milhões/Ton., Safra 2017/2018, CONAB), a aplicação de fungicidas tem sido o método mais utilizado para o controle da doença. Apesar da existência de vários produtos químicos registrados para o manejo desse patógeno, o surgimento de linhagens resistentes tem causado preocupação ao setor agrícola, recentemente tem se reportado resistência ao princípio ativo dicarboxamida em alguns isolados em China (Li et al., 2017).

Atualmente, o incentivo à diminuição do uso de agroquímicos tem favorecido os programas de manejo integrado da doença, como parte desse manejo, têm-se o controle biológico, destacando o uso de alguns produtos baseados em formulações contendo fungos e bactérias (Zeng et al. 2012). O controle biológico de *S. sclerotiorum* começou ser pesquisado no final da década de 1970 quando a problemática fitossanitária do mofo branco adquiriu importância, atualmente existem mais de trinta espécies de fungos e bactérias conhecidas por suas ações inibitórias contra esse patógeno (Zeng, 2012). Dentre os fungos destacam-se as espécies micoparasitas de escleródios, que são pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Clonostachys* e *Coniothyrium* (Jones et al., 2014; Wu et al., 2018)

O filo Actinobactéria pertencentes à ordem Actinomycetales reúne um grande número de espécies que possuem destacado potencial biotecnológico (Cuesta et al., 2012). Esse grupo, constituído principalmente por bactérias filamentosas, Gram-positivas, com grande conteúdo de citosina e guanina (G+C mol%) em seu DNA (Doubou et al., 2002), possuem grande diversidade morfológica e fisiológica. A maioria delas é aeróbia, quimiorganotróficas, mesófilas e crescem melhor em pH próximo a 7,0 (Kämpfer 2012). Além disso, as actinobactérias representam cerca de 30% da população total de microrganismos do solo (Kenedy 1999).

As actinobactérias são amplamente distribuídas na natureza principalmente no solo e estão envolvidas em muitos processos biológicos, onde se destacam como potenciais controladores de patógenos e promotores de crescimento de plantas (Beneduzi et al., 2013). Diversas actinobactérias possuem notável capacidade de produção de metabólitos secundários (antifúngicos e antibacterianos) contra diversos patógenos, entretanto, têm sido descritos como colonizadores de raízes (Khamna et al., 2009). Além disso, destacam-se como produtores de agentes antitumorais, anti-helmínticos, herbicidas, inseticidas sendo que membros do gênero *Streptomyces* são responsáveis pela produção de mais de 70% dos antibióticos conhecidos atualmente (Bérdy, 2005).

Espécies de *Streptomyces* são consideradas como os principais produtores de enzimas hidrolíticas no solo. A produção destas moléculas por parte destes microrganismos tem sido reportado como um dos principais mecanismos de ação para o controle de fungo patogênicos (Al-Askar et al., 2011; De Corato et al., 2017). Esses produtos são o alvo de projetos pesquisa no mundo inteiro como solução emergente aos diferentes problemas na área da biotecnologia, particularmente bioprospecção de biomoléculas com aplicabilidade na área agrícola.

A aplicação de novas técnicas para a prospecção de microrganismos, como é o caso do mapeamento do genoma, pode ser empregado para descoberta de produtos naturais. O uso combinado de engenharia metabólica e a biologia sintética favoreceram o descobrimento e desenvolvimento de produtos naturais produzidos por microrganismos (Rutledge e Challis, 2015; Katz e Baltz, 2016). O mapeamento do genoma consiste em descrever o conjunto gênico presente em todos DNA do organismo alvo. Nos anos recentes, esta técnica é aplicada com grande sucesso no grupo de actinobactérias, especificamente o gênero *Streptomyces* e tornou-se uma abordagem nova e rápida para identificar genes anteriormente desconhecidos (Olano et al., 2014; Ochi, 2016).

Considerando esse panorama, com o desenvolvimento deste trabalho pretende-se selecionar actinobactérias antagonistas a *S. sclerotiorum* produtoras de enzimas quitinolíticas e glucanolíticas, assim como, identificar actinobactérias produtoras de metabólitos secundários, sua fração ativa e os genes envolvidos na produção dessa fração.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Isolados de Actinobactérias

As actinobactérias utilizadas neste trabalho (55) foram previamente isolados de solos de diversos biomas Brasileiros (Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga) depositadas na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA), localizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental (Embrapa - Meio Ambiente) (Anexo 1). Todos os isolados foram reativados em meio ISP2 (Extrato de levedura e malte) e/ou GY (Glicose e levedura) e incubados a 28°C por 72 - 90 h antes do início de cada experimento.

5.2.2. Avaliação de Actinobactérias com atividade enzimática quitinolítica e glucanolítica

Os 55 isolados antagonistas de *S. sclerotiorum* previamente selecionados, foram avaliados quanto à produção de enzimas hidrolíticas por meio do crescimento em meio mínimo (MM) suplementado. Para a análise qualitativa, MM com quitina coloidal (1%) Sigma (C7170) e Laminarina (1%) Sigma (L9634) foram utilizados. O diâmetro (mm) dos halos ao redor das colônias foi medido e utilizado para indicar a atividade de quitinase e glucanase. Diâmetros entre 0 e 10 mm representam baixa (+), entre 11 e 20 mm moderada (++) e entre 21 e 30 mm alta (+++) atividade. A atividade enzimática dos isolados foi quantificada como descrito por El-Tarabily et al., (2000), Brevemente, a atividade quitinase foi calculada por meio da medição da liberação de *N-acetil-D-glucosamine* (Naga) a partir da quitina coloidal, a realização da curva padrão para Naga foi feita usando uma curva de 0.005 mg até 5 mg (com faixa de linearidade entre 0.02 e 1.25 mg). No caso da atividade glucanase, foi calculada a liberação de glicose, para isso, foi feita uma curva padrão de 0.125 mg até 5 mg de glicose (com faixa de linearidade entre 0.125 e 3mg). Uma unidade de IU de enzima é definida como a quantidade de enzima que consegue catalisar a formação de 1 μ mol do produto por minuto nas condições de ensaio determinadas (Colombatto e Beauchemin 2003).

5.2.3. Produção de metabólitos secundários de Actinobactérias

Extratos orgânicos de Actinobactéria foram obtidos após 2 semanas de crescimento em caldo Batata Dextrose (BD) mantido a 28°C sob agitação (140 rpm). A biomassa produzida foi separada do caldo de cultivo por centrifugação. Os extratos aquosos resultantes foram acidificados (pH:3) usando HCL 1M e, posteriormente submetidos à extração líquido: líquido com o solvente orgânico Diclorometano (DCM) e Acetato de Etila (ACT) em proporção 1:3. Esses extratos foram evaporados usando rotavaporador Buchi R-125, a 40°C, sob pressão reduzida. A massa do extrato orgânico foi pesada e posteriormente armazenada a 4°C.

5.2.4. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos

A atividade antifúngica foi avaliada pela técnica de difusão em ágar, seguindo a metodologia de Santos et al. (2011) usando *Sclerotinia sclerotiorum* como alvo, Em resumo, utilizaram-se discos de papel esterilizados e impregnados com 10 µL (5 mg.mL⁻¹) dos extratos brutos resuspendidos em DCM ou ACT respectivamente. Discos de cinco mm contendo micélio ativo de *S. sclerotiorum* crescido em meio BDA, foram depositados no centro das placas de Petri (9cm) e posteriormente incubadas a 22±2°C. A verificação da inibição foi realizada após 72h e 24h respectivamente. No(s) extrato(s) com a melhor atividade *in vitro*, foi determinada a concentração inibitória mínima (MIC) para isto uma solução stock de 5 mg.mL⁻¹ do extrato ativo selecionado foi preparada e, posteriormente foram feitas diluições seriadas até 0.165 mg.mL⁻¹. Dessas concentrações foram aplicados 10 uL de extrato em discos de papel filtro estéril, a uma distancia de 3 cm do fungo.

5.2.5. Separação dos compostos

O extrato bruto (678 mg) foi submetido à separação cromatográfica preparativa no sistema Biotage XP-sil, 100 g, SNAP cartridge (40-63 µm, 60 Å x 150 mm) numa razão de vazão de 40 mL min⁻¹ usando uma gradiente de hexano: acetato de etila de 60:40 até 0:100. 72 Frações de 20 mL foram coletadas em 90 tubos de 16 x 150 mm. Posteriormente, a CCD foi feita com cada amostra a fim de evidenciar possíveis agrupamentos das frações resultantes. Todas as frações resultantes foram reavaliadas usando a metodologia 5.2.4 com o fim de confirmar a atividade antagônica contra *S. sclerotiorum*.

5.2.6. Análise LC-MS das frações ativas

As frações ativas foram diretamente infundidas em um espectrômetro de massas Bruker (AmaZon). A Ionização por Electrospray (ESI) foi utilizada como a fonte de ionização no modo positivo e negativo. A análise dos extratos consistiu em inserção direta com injeção de 3 µL de amostra. A voltagem do capilar foi otimizada à - 4500 V. O nitrogênio foi usado como gás de nebulização a 220 °C com fluxo de 4,0 L min⁻¹ e pressão de 8 psi. Para a fragmentação: o Hélio foi usado como gás de colisão O software de controle de aquisição e tratamento de dados foi o MassLynx, versão 4.1 (Waters). Dados de MS foram obtidos para valores de m/z na gama de 70 a 2000 Da, com um tempo de varrimento de 0,5 s e um atraso entre varredura de 0,02 s ao longo de um tempo de análise de 13 minutos.

5.2.7. Extração de DNA e anotação do genoma do isolado 1AS2a (*Streptomyces cavourensis*)

Extração de DNA genômico foi obtido utilizando o kit *Ultra Clean® Microbial DNA Isolation MOBio* (Qiagen), de acordo com especificações do fabricante. Parâmetros de qualidade e integridade do DNA foram conferidos antes do sequenciamento. Para a obtenção do genoma foi realizado o sequenciamento de uma biblioteca genica usando 2 moléculas simples em tempo real (SMRT) com a técnica de PacBio RS SMRT (Pacific biosciences) formando uma sequencia consenso com comprimento de 7,600 bp. O promécio da cobertura foi de 143.1 x. A sequênciã consenso foi caracterizada e anotada usando a plataforma RAST (Annotations using Subsystems Technology). Com o fim de detectar os operons gênicos envolvidos na produção de metabolitos secundários presentes no genoma do isolado 1AS2a, foi utilizado o algoritmo antiSMASH 3.05 (Medema et al. 2011).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Avaliação de atividade enzimática quitinolítica e glucanolítica

A avaliação dos isolados de actinobactéria mostrou que dez deles possuem atividade enzimática quitinolítica e glucanolítica. (Tabela 7). Dos isolados avaliados, 29 apresentaram algum tipo de hidrólise no meio suplementado com quitina coloidal. Para o caso do meio com laminarina, 17 actinobactérias apresentaram halo de hidrólise. Os três antagonistas que apresentaram os melhores halos de hidrólise (1AS2a, Caat P5 55 e Caat P8 79) foram avaliados quantitativamente para conhecer as atividades enzimáticas descritas. Os três isolados, 1AS2a, Caat P5 55 e Caat P8 70 apresentaram atividade quitinase (β 1-4 -N- acetilglucosaminidase) de 0.03, 0.22 e 0.16 UI respectivamente. A atividade glucanase (β 1-3-gluconase) foi 0.23, 0.25 e 0.26 UI respectivamente.

Tabela 7. Avaliação da atividade enzimática e produção de metabólitos secundários por actinobactérias de diferentes biomas brasileiros. Atividade Enzimática; baixa (+), média (++), alta (+++). Inibição por metabólitos; baixa (+), média (++), alta (+++). DCM: Extrato orgânico obtido com Diclorometano, ACT: Extrato orgânico obtido com Acetato de Etila.

Isolado	Atividade enzimática		Metabólitos secundários	
	Quitinase	Glucanase	DCM	ACT
Can V1 07	+	+	++	-
Can V1 22	+	-	-	-
Can V1 37	+	-	++	-
Can V1 58	+	-	-	-
Can V1 52f	-	-	++	-
Can V2 11	+	-	+	+
Can V2 39	+	-	+++	-
Can V2 06f	+	-	+++	-
Can V2 11f	+	-	-	-
Can V2 13	+	-	-	-
Can V2 15	+	-	-	-
Can V2 17	+	+	-	-
Can V2 32f	+	-	+	-
Can V2 33f	-	+	-	-
Can V2 37f	-	-	+	-
Can V3 62f	+	-	+	-
Can V2 22	+	-	-	-
Bc V2 18f	-	-	-	-
Bc V3 01f	+	-	-	-
Bc V3 14f	-	-	+++	-
Can V2 18f	+	-	+	+
Can V2 22f	+	-	-	-
Bc V1 06	+	-	-	-
Bc V1 06f	-	-	+	-
Bc V3 18f	-	-	-	-
Bc V2 18	+	-	-	-
Bc V1 20f	+	-	-	-
Bc V3 05f	-	+	-	-
Bc V3 10f	-	+	+	+
Can V2 34	-	-	-	+
BcV1 37	-	-	+	-
1 AS 2	++	-	+	-
3 AS 4	-	-	+	-
1 AS 6	-	+	-	+
1 BR 6	-	+	-	-
3 BS 2	-	+	-	+
1 BR2	-	-	-	-
2 BR 2	+	+	-	-
3 AR 7	-	-	-	-
1 AS 2a	++	+	+++	+
1 AS 2c	++	-	+	+
2 BS 5	+++	-	++	+++
1 BR 5	+	+	-	++
2 BS 1	+	+	+	-
3 BS 4	++	+	+++	++
2 BR 3	-	-	-	-
2 BS 7	-	-	-	-
Caat P5 - 55	+++	+	++	+
Caat P8- 52	-	-	-	-
Caat P8 - 78	-	-	+++	+
Caat P8 - 79	+++	+	+	++
Caat P5 -102	-	-	+	++
Caat P8- 34	-	+	+	-
Caat P8 - 35	-	-	-	-
Caat P8 - 47	-	+	-	-

5.3.2. Avaliação dos metabólitos secundários biologicamente ativos contra *S. sclerotiorum*

A avaliação dos extratos orgânicos de Actinobactéria mostrou atividade inibitória para *S. sclerotiorum* (Tabela 7). 26 extratos de actinobactérias (45%) obtidos com DCM apresentaram inibição do crescimento do fungo, sendo que seis deles apresentaram alta inibição, para o caso do ACT, 15 extratos apresentaram inibição, sendo que um deles apresentou alta inibição (Tabela 7). No total, 30 isolados apresentaram atividade inibitória com algum dos solventes orgânicos utilizados, sendo que 10 dos 55 isolados avaliados em total apresentaram inibição com os ambos solventes. (Tabela 7). Considerando os resultados obtidos nos dois testes, o isolado 1AS2a, foi selecionado para a determinação da MIC, a qual para *S. sclerotiorum* usando o solvente DCM foi de $165 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e usando o solvente ACT foi de $1.250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 16).

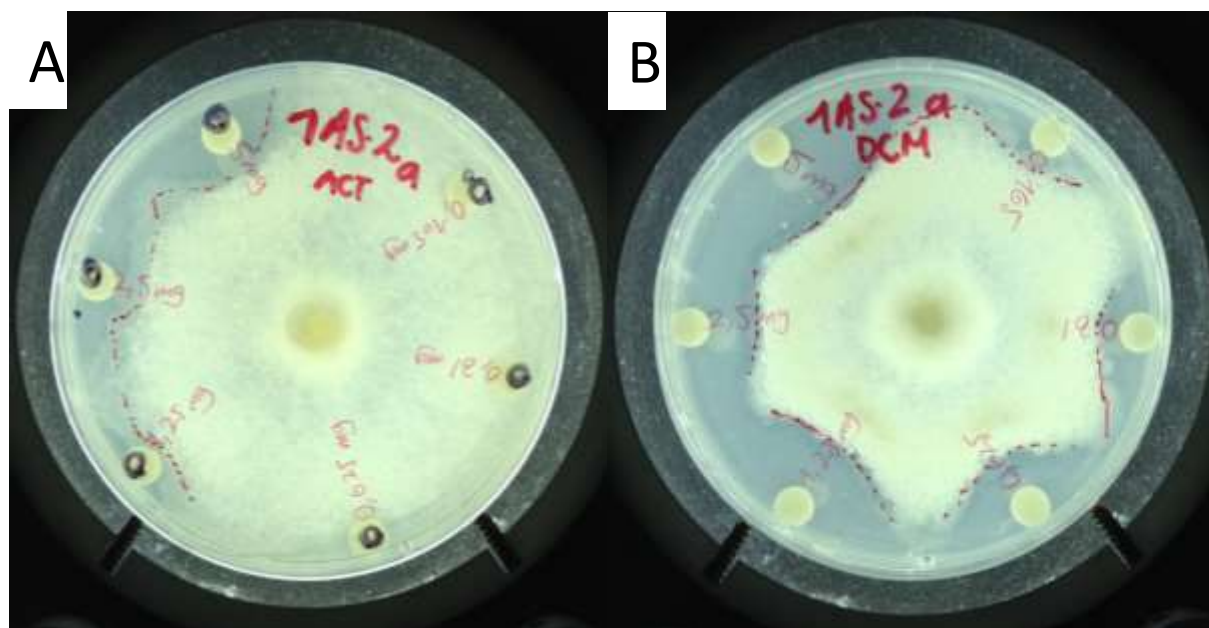


Figura 16. Avaliação da inibição pelos extratos orgânicos da linhagem 1AS2a (*Streptomyces cavourensis*) contra *S. Sclerotiorum*, em concentrações decrescentes de 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.31 e 0.165 mg. A: Extrato obtido com Acetato de Etila, B: Extrato obtido com Diclorometano.

5.3.3. Desrepliação dos extratos brutos com atividade antifúngica

Os espectros de massas obtidos para as quatro frações ativas (Fr. 12, 13, 14 e 15) de *Streptomyces cavourensis* (1AS2a), tanto no modo positivo quanto no modo negativo apresentaram semelhanças nos perfis metabólicos dos extratos obtidos (Figura 17, 18, 19 e 20). Entretanto, foi possível identificar um composto majoritário no modo negativo com m/z de 668.2 (Figura 17a, 18a, 19a e 20a). A fragmentação da massa majoritária, revelou fragmentos idênticos à massa exata para a Bafilomicina A₁ (622.4) (CAS: 88899-55-2) sendo no modo negativo de [M + 2Na⁺] (Figura 17b, 18b, 19b e 10b) (Werner e Hagenmaier 1984, Crevelin et al., 2013). Estudo posterior de Ressonância Magnética Nuclear será necessário para confirmar a presença do composto ativo.

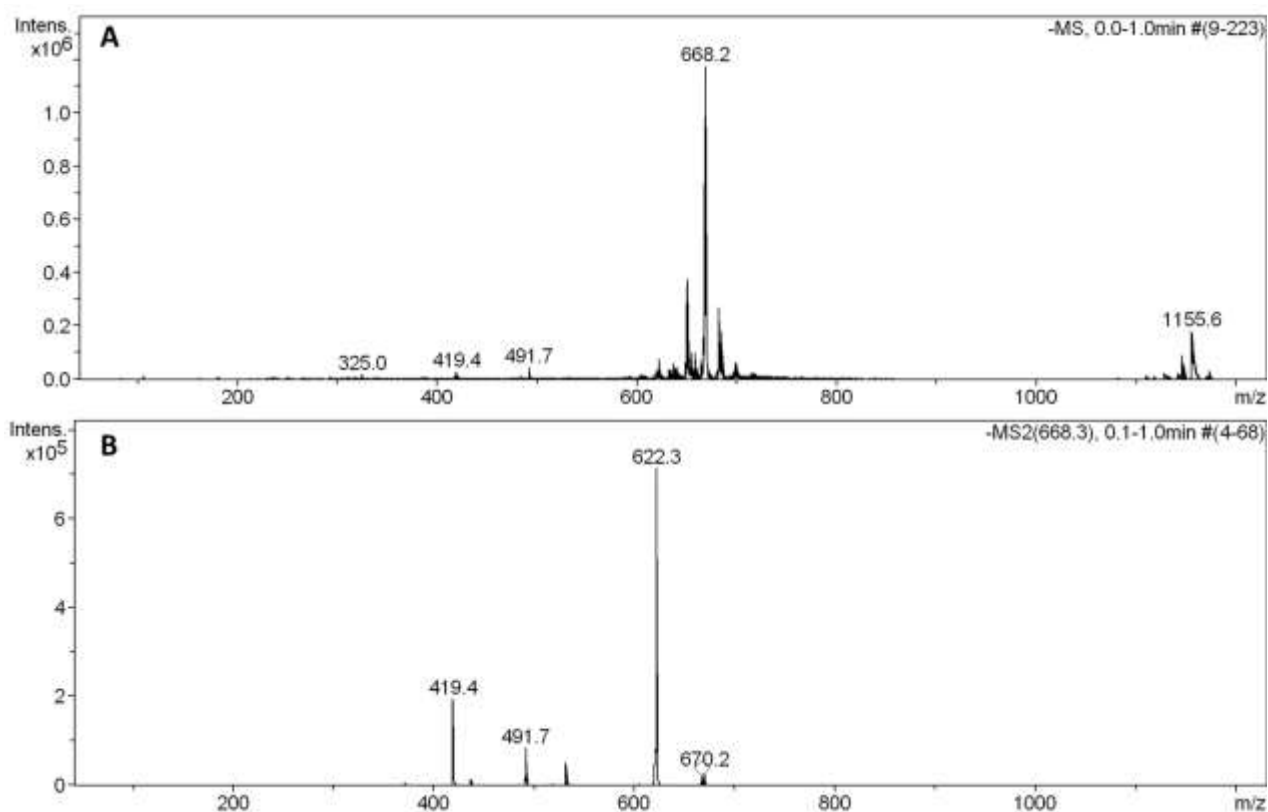


Figura 17. Espectros de massas da fração 12 (ESI MS) do isolado 1AS2a (*Streptomyces cavourensis*) com atividade antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum*. A: Espectro de massas da fração 13 em modo negativo. B: Padrão de fragmentação da massa majoritária (668.2).

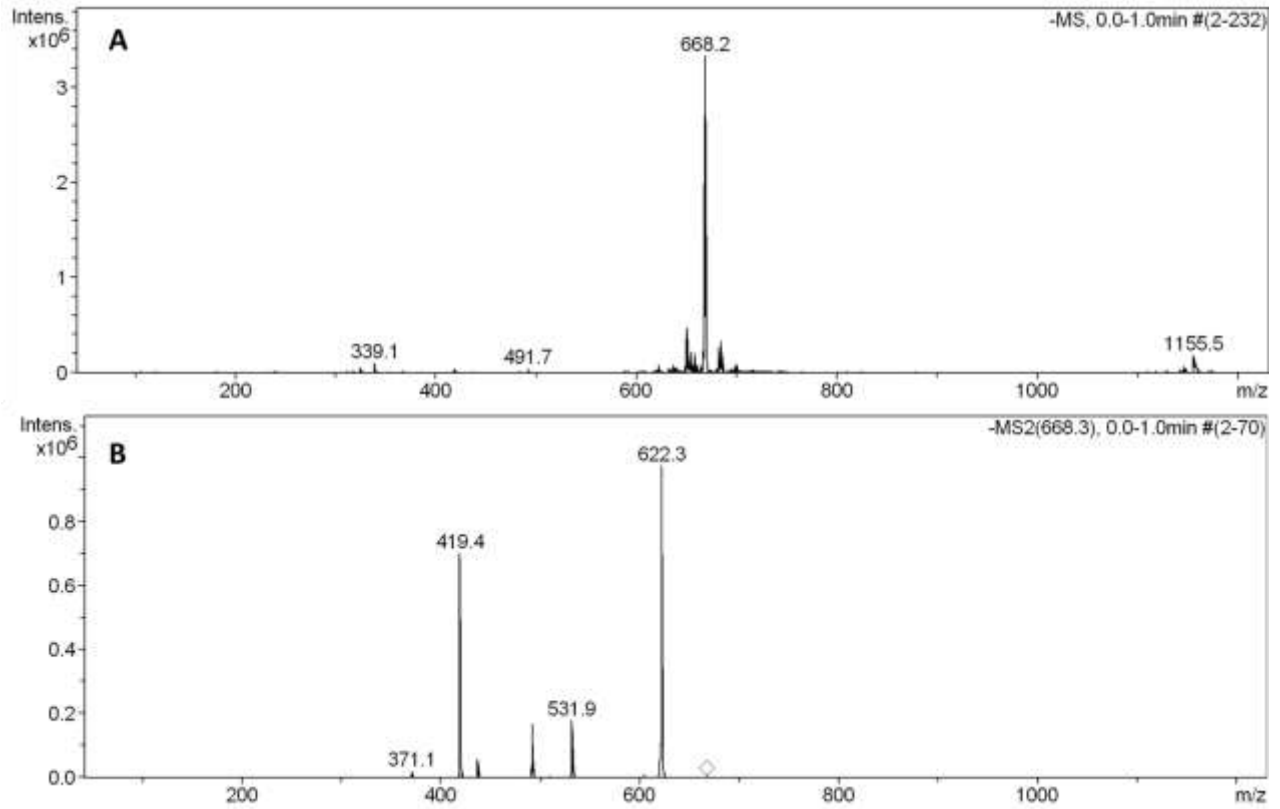


Figura 18. Espectros de massas da fração 13 (ESI MS) do isolado 1AS2a (*Streptomyces cavourensis*) com atividade antagônica contra *Sclerotinia sclerotiorum*. A: Espectro de massas da fração 13 em modo negativo. B: Padrão de fragmentação da massa majoritária (668.2).

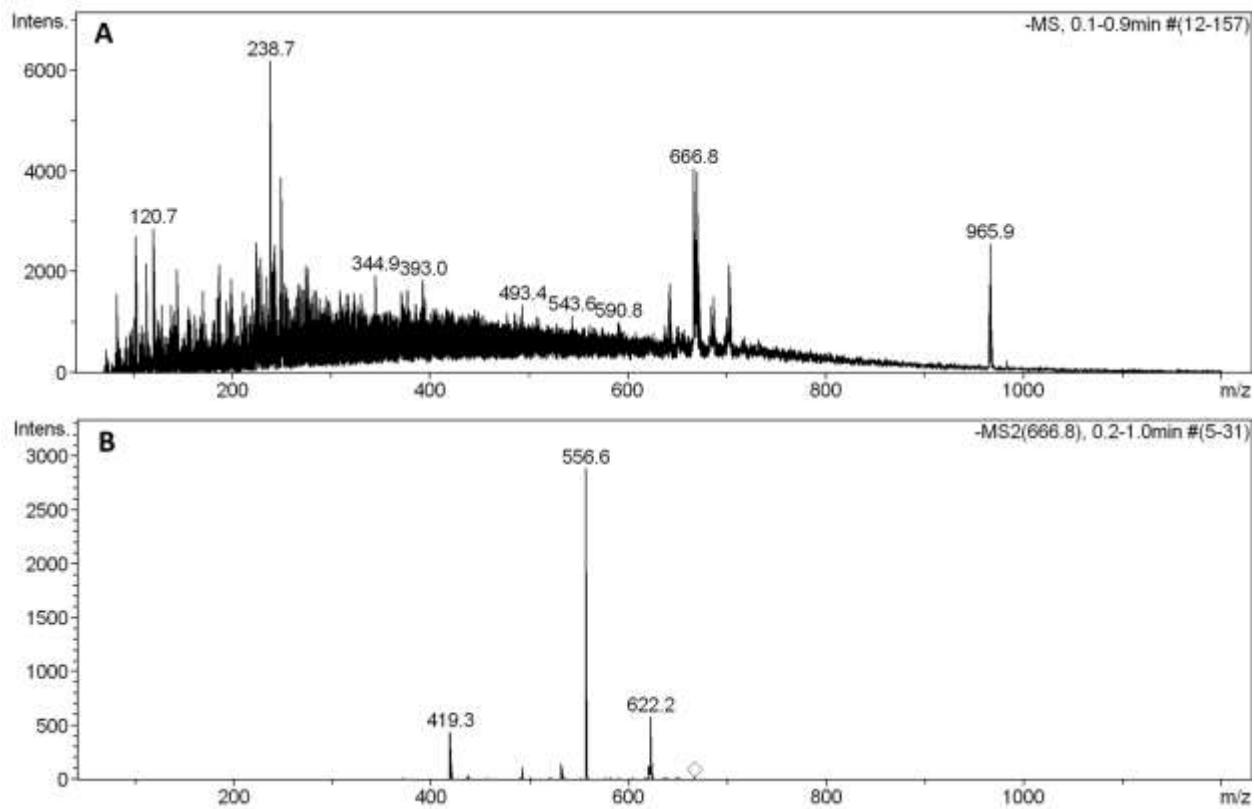


Figura 19. Espectros de massas da fração 14 (ESI MS) do isolado 1AS2a (*Streptomyces cavourensis*) com atividade antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum*. A: Espectro de massas da fração 13 em modo negativo. B: Padrão de fragmentação da massa majoritária (666.8).

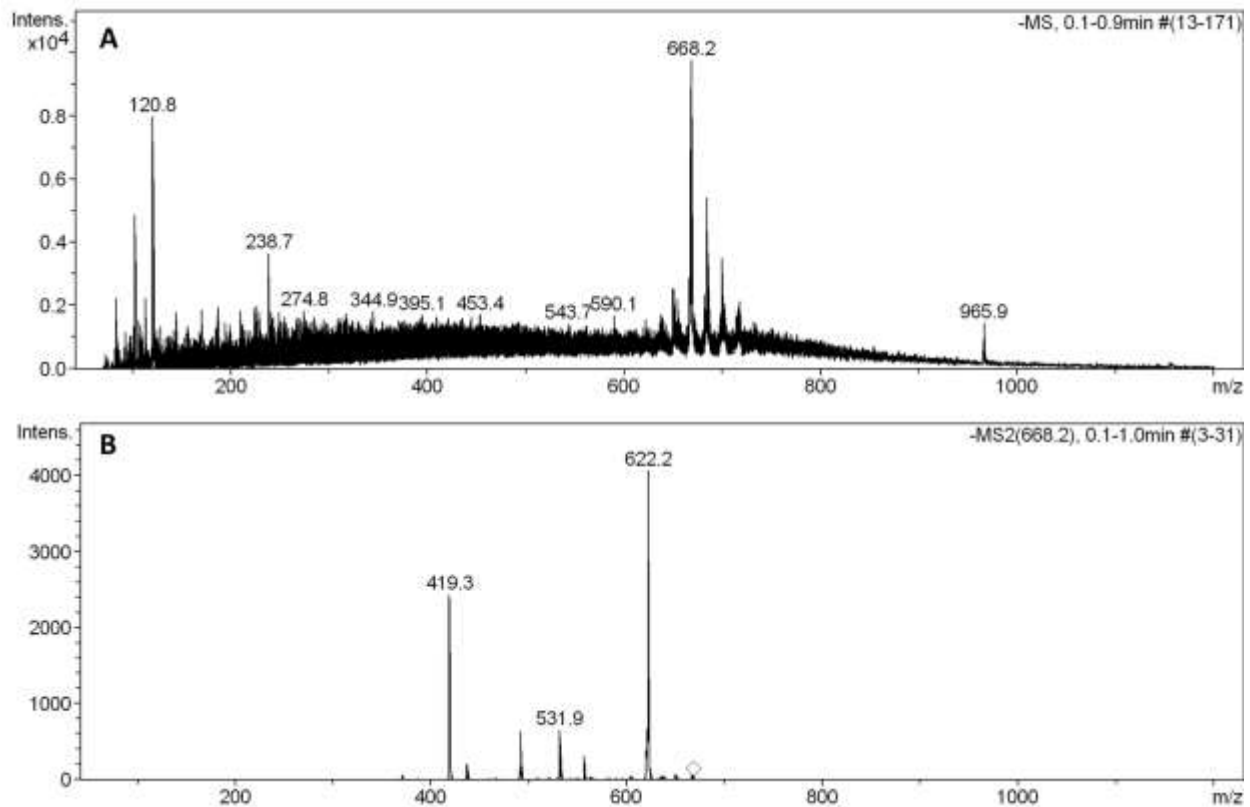


Figura 20. Espectros de massas da fração 15 (ESI MS) do isolado 1AS2a (*Streptomyces cavourensis*) com atividade antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum*. A: Espectro de massas da fração 13 em modo negativo. B: Padrão de fragmentação da massa majoritária (668.2).

5.3.4. Anotação do genoma da linhagem 1AS2a (*Streptomyces cavourensis*)

A anotação genômica de *Streptomyces cavourensis* (1AS2a) revelou um genoma com tamanho total de 7.63 Mb, com elevado conteúdo de G+C% (72.1) característico para linhagens de *Streptomyces*. No total, possui 6590 sequências codificantes e, possui 82 genes que codificam ácido ribonucleico (RNA). A anotação do RAST (Figura 21) evidenciou 22 operons envolvidos no metabolismo secundário, 156 genes relacionados ao estresse, dentro deles 27 relacionados a estresse osmótico, 58 genes relacionados a estresse oxidativo, 16 ao choque térmico e 14 relacionados à detoxificação.

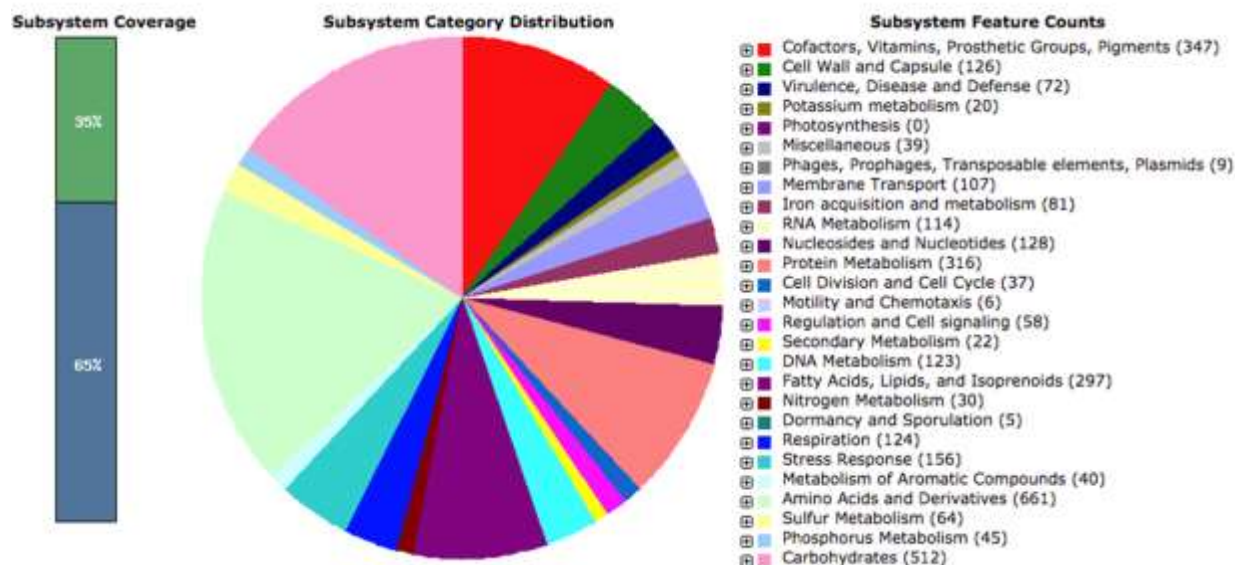


Figura 21. Anotação do genoma do isolado 1AS2a, usando a ferramenta bioinformática RAST.

A presença elevada de genes relacionados a mecanismos de adaptação reflete ao nicho do qual foi isolado esta linhagem, como é solo do bioma Cerrado, que apresenta elevados níveis de acidez, temperatura e pouca disponibilidade de nutrientes.

Com base nos dados do algoritmo do antiSMASH (3.0.5) foram identificados 33 operons relacionados à síntese de metabólitos secundários conhecidos. Dentre eles foram encontradas cinco envolvidos na formação de enzimas policétidas sintase (PKS), 8 envolvidos nas sínteses de peptídeos não ribossomais (NRPS), assim como outros envolvidos na síntese de terpenos, ectoínas, sideróforos, lantipeptídeos, bacteriocinas e melaninas. 12 operons apresentaram, <70% de similaridade para as proteínas putativas: Gamma Gutirilactona, Griseobactina, Coelicelina, Ectoina, Desferroxamina B, SRO15 -2005, AmfS, Nonactina, Bafilomicina, Frontalamidas, Melanina, Acylresorcinol e Isorenierateno. 3 operons apresentaram entre 69 e 30 % de similaridade: Hopene, Botromycian A2, Lactazole. Entretanto, 12 operons formaram um grupo que apresentaram similaridade abaixo de 30%: WS9326, Oxazolomicina, Herboxidiena, Steffimicina, Fosfonoglicanos, Pristinamicina, Rabelomicina, Fenalinolactona, Asukamicina, Laspartomicina, Talisomicina e Valinomicina, esse grupo tem maior destaque, devido a que, dado a baixa porcentagem de similaridade, pode se tratar de novos compostos e/ou derivados com atividade biológica.

Foi encontrado o operon gênico da classe do policetido sintase tipo I (PKS I), que possui identidade de 100% com o gene da Bafilomicina (Figura 22), esse operon contém 5 genes (ctg1_5976, 5977, 5978, 5979 e 5980), os quais apresentam conformação similar, contendo enzimas: acil transferase, ceto sintase e ceto reductase. (Figura 22)

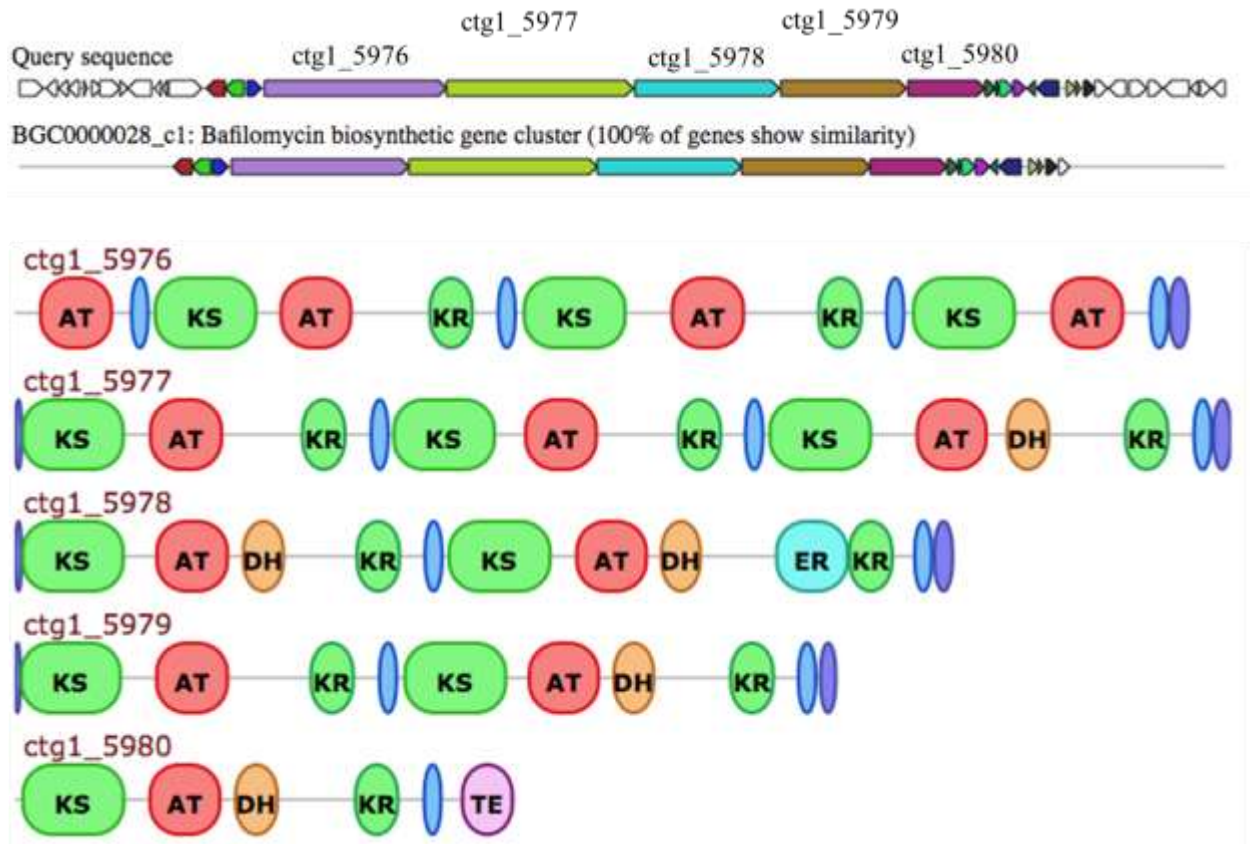


Figura 22. Operon gênico da classe do policetido sintase tipo I (PKS I), no genoma do isolado 1AS2a.

5.4. Discussão

No Brasil, perdas na safra de culturas como feijão e soja, causadas por fungos, especialmente *S. sclerotiorum*, são uma grande preocupação para os produtores e um desafio para pesquisadores (Fróes et al., 2012). Estudo recente feito pela Embrapa demonstrou que atualmente existe no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento registrados 31 produtos para o controle de mofo branco, sendo 26 deles agroquímicos e cinco biológicos, estes últimos sendo exclusivamente a base do fungo *Trichoderma* sp. (Agrofit, 2017).

A busca de novos Microrganismos e/os seus produtos naturais tem sido focalizada no isolamento de espécies de nichos inexplorados e/ou extremos, com o fim de descobrir novas espécies com características biológicas específicas. Entretanto, a utilização de agentes biológicos no tratamento de sementes tem sido uma tendência ultimamente no manejo integrado do mofo branco (Ferguson et al., 2001).

Neste estudo, 55 linhagens de actinobactérias provenientes de biomas que apresentam condições estressantes, foram avaliadas para a produção de compostos extracelulares com atividade antagônica contra *S. sclerotiorum*. Estudos prévios de uso de microrganismos antagonistas contra *Sclerotinia sclerotiorum*, têm sido exclusivamente focados em fungos do gênero *Trichoderma*, trabalhos prévios feitos com esses microrganismos descrevem que, pode existir uma redução de até 62,5% no número de escleródios viáveis no solo e conseqüentemente a infecção e desenvolvimento da doença (Menendez e Godeas, 1998).

Bactérias filamentosas, especialmente do gênero *Streptomyces*, produzem amplo espectro de metabólitos secundários, bem como uma variedade de enzimas de degradação da parede de células de fungos, incluindo quitinases, glucanases e peptidases (Yuan e Crawford, 1995; Barka et al., 2016). Essas enzimas são muito importantes no controle biológico, uma vez que, a parede celular de vários fungos fitopatogênicos, incluindo *S. sclerotiorum*, é constituída principalmente por quitina, glucano e proteína (Jones, 1970; Le Tourneau, 1979; Patil et al., 2010; Kaur et al., 2013). Neste trabalho, a avaliação *in vitro* das enzimas extracelulares evidenciou três isolados, 1AS2a, Caat P5 55 e Caat P8 79, que produzem quitinases (0.03, 0.22 e 0.16 UI respectivamente) e glucanases (0.23, 0.25 e 0.26 UI respectivamente). Estudos similares, Já relatam atividade enzimática hidrolítica de isolados de actinobactérias com capacidade antagônica contra espécies de *Sclerotinia*. El-Tarabily e colaboradores (2000) avaliaram um isolado de *Streptomyces viridodiasticus* contra *Sclerotinia minor* e avaliaram a sua atividade enzimática, para a atividade quitinase o resultado foi 4.08 UI. Entretanto, para a atividade glucanolítica foi de 0.49 UI. Em outro estudo, Fróes e colaboradores (2012) avaliaram um isolado de *Streptomyces* sp. e encontraram atividade correspondente a 0.75 UI para exoquitinase, 0.9 UI para endoquitinase e 0.16 UI para β 1-3 glucanase. Segundo o Woo e colaboradores (2006), a produção de enzimas hidrolíticas como quitinases e glucanases pode ser associada a

uma diminuição significativa dos níveis de *S. sclerotiorum* no solo. Por tanto, seria interessante avaliar em condições de campo os isolados selecionados neste trabalho com o fim de conhecer o desempenho contra fungos fitopatogênicos.

A avaliação dos metabólitos secundários de *Streptomyces cavourensis* (1AS2a) evidenciou efeito antagônico até a concentração de $165 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em um estudo similar (Baharlouei et al., 2011), avaliaram o efeito de 110 isolados de actinobactérias contra *S. sclerotiorum* reportando o valor de $781 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o MIC, isso demonstra a capacidade de isolados de *Streptomyces* para produzir metabólitos ativos contra *S. sclerotiorum* e demonstra como o isolado 1AS2a consegue inibir ainda em concentrações muito baixas.

Os espectros de massas avaliados serviram como parâmetro comparativo com estudos prévios de produção de compostos da família das bafilomicinas por *Streptomyces* sp. (Werner e Hagenmaier 1984, Crevelin et al., 2013) o qual confirma a presença de compostos antifúngicos nas frações dos extratos obtidos a partir do isolado 1AS2a (*Streptomyces cavourensis*). A utilização de ferramentas bioinformáticas, especificamente à anotação dos genomas de *Streptomyces* sp., tem sido de grande relevância na busca de novos compostos bioativos, permitindo identificar os genes ou conjunto de genes que podem estar envolvidos na produção de metabólitos secundários com atividade biológica (Baltz 2017). Assim, como já tem sido descritos trabalhos usando para identificação de compostos antitumorais (Wang et al., 2017), atividade antibacteriana (Undabarrena et al., 2017), e estimulação de crescimento vegetal (Qin et al., 2017), por tanto, é de grande relevância o uso dessas análises para a bioprospecção de novas moléculas com atividade antagônica, com potencial uso agrícola. O uso frequente destas técnicas permitira avançar na busca e caracterização de novos compostos ativos presentes em microrganismos da enorme biodiversidade brasileira, indicando o futuro da bioprospecção na área agrícola.

5.5. Conclusões

Foi evidenciada a produção de enzimas glucanólíticas e quitinolíticas em Actinobactérias com potencial de biocontrole contra *Sclerotinia sclerotiorum*.

Actinobactérias dos três biomas brasileiros avaliados possuem a capacidade de inibir *S. sclerotiorum* pela produção de metabólitos secundários.

Streptomyces cavourensis 1AS2a, produz a Bafilomicina A₁.

O estudo do genoma do isolado *Streptomyces cavourensis* 1AS2a, permitiu a identificação de genes codificantes para compostos extracelulares com atividade biológica.

REFERÊNCIAS

- Agrofit, 2017. Ministerio de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ultima visita, 22/112017. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/ap_praga_detalhe_cons?p_id_cultura_praga=4696&p_tipo_janela=NEW
- Al-Askar AA, Abdul Khair WM, Rashad YM, (2011). *In vitro* antifungal activity of *Streptomyces spororaveus* RDS28 against some phytopathogenic fungi. **African Journal of Agricultural Research**, 6:12;2835–2842.
- Baharlouei A, Sharifi-Sirchi GR, Bonjar GHS, (2011) Biological control os *Sclerotinia sclerotiorum* (iolseed rape isolate) by an effective antagonista *Streptomyces*. **African Journal of Bitechnology**. 10:30; 5785 – 5794.
- Baltz RH, (2017) Molecular beacons to identify gifted microbes for genome mining. **The Journal of Antibiotics**. 70; 639–646
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP, (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 80: 1–43.
- Beneduzia A, Moreira F, Costa PB, Vargas LK, Lisboa BB, Favreto R, Baldanic JI, Passaglia LMP, (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**. 63:94 - 104
- Bérdy J, (2005). Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, 58:1; 1–26
- Colombatto D, Beauchemin K, (2003). A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. **Can. J. Anim. Sci.** 559 - 568
- Companhia Nacional de Abastecimento (2017). Acompanhamento da safra brasileira, grãos. Safra 2017/2018, Segundo levantamento, Novembro 2017.

- Crevelin EJ, Canova SP, Melo IS, Zucchi TD, Silva RE, Moraes LAB, (2013). Isolation and Characterization of Phytotoxic Compounds Produced by *Streptomyces* sp. AMC 23 from Red Mangrove (*Rhizophora mangle*) . **Appl Biochem Biotechnol.** 171:1602–1616
- Cuesta G, De la Fuente RG, Abad M, Fornes F, (2012). Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. **Journal of Environmental Management.** 95; S280 - S284
- De Corato U, Salimbeni R, De Pretis AJ, (2017) Suppression of soil-borne pathogens in container media amended with on-farm composted agro-bioenergy wastes and residues under glasshouse condition. **Plant Dis Prot.** 1 – 14.
- Doumbou CL, Hamby Salove MK, Crawford DL, Beaulieu C, (2002). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection**, 82: 3;85-102.
- El-Tarabily KA, Solimana MH, Nassar AH, Al-Hassania HA, Sivasithamparam K, McKennad F, Hardy GE, (2000). Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology.** 49: 573 – 583
- Ferguson LM, Shew BB (2001) Wheat straw mulch and its impacts on three soilborne pathogens of peanut in microplots. **Plant Disease**, 85:661-667.
- Fróes A, Macrae A, Rosa J, Franco M, Souza R, Soares R, Coelho R, (2012). Selection of a *Streptomyces* strain able to produce cell wall degrading enzymes and active against *Sclerotinia sclerotiorum*. **The Journal of Microbiology.** 50:5;798–806.
- Jones D. 1970. Ultrastructure and composition of the cell walls of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Transact. Brit. Mycol. Soc.** 54: 351–360.
- Jones EE, Rabeendran N, Stewart A. (2014). Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of cabbage by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* spp. **Biocontrol science and Tecnology.** 24:12, 1363 – 1382.

- Le Tourneau D. (1979). Morphology, Cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**. 69: 887–890.
- Li J, Kang T, Talab KMA, Zhu F, Li J. (2017). Molecular and biochemical characterization of dimethachlone resistant isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 138, 15-21.
- Kämpfer P. (2012). Genus I. Streptomyces. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W, Whitman WB (eds) **Bergey's manual of systematic bacteriology**, the Actinobacteria, vol 5, 2nd edn. Springer, New York, pp 1455–1462.
- Katz L, Baltz RH, (2016). Natural product discovery: past, present, and future. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 43, 155–176.
- Kaur T, Sharma D, Kaur A, Manhas RK. (2013). Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes. **Arch. Phytopathol. Plant Prot.** 46:14;1756–1768.
- Kennedy AC, (1999). Bacterial diversity in agrosistemas. **Agriculture ecosystems and environment**. 74:3;65 – 76.
- Khamna S, Yokota A, Lumyong S, (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. **World J Microbiol Biotechnol.** 25:649–655
- Menendez AB, Godeas A (1998) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742). **Mycopathologia** 142:153-160.
- Olano C, Méndez C, and Salas JA. (2014) Strategies for the design and discovery of novel antibiotics using genetic engineering and genome mining. Chp. 1, in **Antimicrobial Compounds: Actual Strategies and New Alternatives**, eds T. G. Villa and P. Veiga-Crespo (Berlin: Springer-Verlag), 1–25.

- Ochi K. (2016). Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects. **J. Antibiot.** (Tokyo) 70, 25–40.
- Patil HJ, Srivastava AK, Kumar S, Chaudhari BL, Arora DK (2010) Selective isolation, evaluation and characterization of antagonistic actinomycetes against *Rhizoctonia solani*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 26;12:2163–2170.
- Qin S, Feng WW, Wang TT, Ding P, Xing K, Jiang JH. (2017). Plant growth-promoting effect and genomic analysis of the beneficial endophyte *Streptomyces* sp. KLBMP 5084 isolated from halophyte *Limonium sinense*. **Plant Soil** DOI 10.1007/s11104-017-3192-2
- Rutledge PJ, Challis GL. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Nat. Rev. Microbiol.** 13, 509–523.
- Santos SN, Oliveira LKX, Melo IS, Velozo ES, Roque MRA, (2011). Antifungal activity of bacterial strains from the rhizosphere of *Stachytarpheta crassifolia*. **African Journal of Biotechnology**, 10:4996-5000.
- Undabarrena A, Ugalde JA, Seeger M, Cámara B, (2017) Genomic data mining of the marine actinobacteria *Streptomyces* sp. H-KF8 unveils insights into multi-stress related genes and metabolic pathways involved in antimicrobial synthesis. **PeerJ** 5:e2912; DOI 10.7717/peerj.2912
- Wang W, Song T, Chai W, Chen L, Chen L, Lian XL, Zhang Z, (2017). Rare Polyene-polyol Macrolides from Mangrove-derived *Streptomyces* sp. ZQ4BG. **Nature Scientific Reports** | 7: 1703 | DOI:10.1038/s41598-017-01912-z.
- Werner G, Hagenmaier H. (1984). Metabolic products of microorganisms. 224 Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics production, isolation chemical structure and biological activity. **Journal of antibiotics.** 37:2; 110 -117.
- Woo SL, Scala F, Ruocco M, Lorito M, (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology.** 96, 181–185.

Wu HQ, Sun L, Liu F, Wang ZY, Cao CW. (2018). Preparation of dry flowable formulations of *Clonostachys rosea* by spray drying and application for *Sclerotinia sclerotiorum* control. **Journal of Integrative Agriculture**. 17: 3, 613 – 620.

Yuan WM, Crawford DL. (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 3119– 3128.

Zeng W, Kirk W, Hao J, (2012). Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. **Biological Control**, 60: 141–147.

6. *STREPTOMYCES RHIZOSPHAERICOLA* SP. NOV., UMA NOVA ACTINOBACTÉRIA QUITINOLÍTICA ISOLADA DO CULTIVO DE TRIGO DO CERRADO

Resumo

A actinobactéria 1AS2c^T foi isolada da rizosfera de trigo do Cerrado brasileiro. A análise do rRNA 16S evidenciou similaridade com três linhagens tipo, incluindo *S. cavourensis* (NBRC 13026^T) 98,17 %, *S. albolongus* (NBRC 13465^T) 98,10% e *S. araujoniae* (ASBV-1^T) 97,89%. Análise de sequência de Multilocus baseado em seis genes; 16S rRNA, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *trpB* mostrou que o isolado 1AS2c^T possui diferenças com as linhagens tipo mais próximas indicando a formação de um novo ramo filogenético. Análise de Hibridização DNA-DNA evidenciou baixa relação com as linhagens tipo *S. cavourensis* (NBRC 13026^T), *S. albolongus* (NBRC 13465^T) e *S. araujoniae* (ASBV-1^T) com valores abaixo do limite estabelecido para a delimitação de espécies sendo eles, 62,0, 28,5 e 30, % respectivamente. As características fenotípicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas mostraram consistente relação com o gênero *Streptomyces* e confirma o isolado 1AS2c^T como pertencente a uma distinta espécie genômica. Assim, nós propomos que o isolado 1AS2c CMAA 1647^T (=NRRL B-65479^T =DSM 105299^T) pode ser classificado como linhagem tipo *Streptomyces rhizosphaericola* sp. nov.

Palavras-chave: *Streptomyces rhizosphaericola* sp. nov.; Rizosfera; Propriedades fenotípicas e morfológicas

Abstract

Strain 1AS2c^T, aerobic, Gram-reaction positive, actinobacterium non-motile, a wheat rhizosphere actinobacteria, was isolated from Brazilian Cerrado biome. Analysis of the 16S rRNA gene sequence indicates a similarity relationship with a three type strains, includes of *Streptomyces cavourensis* (NBRC 13026^T) 98.17%, *S. albolongus* (NBRC 13465^T) 98.10% and *S. araujoniae* (ASBV-1^T) 97.89%. A multilocus sequence analysis (MLSA) performed concatenating 16S rRNA, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* and *trpB* gene sequences evidence that the strain 1AS2c^T shown distances with all of these strains indicating that it forms the nucleus of a novel *Streptomyces* species. Low DNA–DNA relatedness with these organisms indicated that the strain 1AS2c^T belonged to a distinct genomic species; 62, 28.5 and 30 % respectively. These values are below the threshold established for species delimitation. The phenotypic, physiological, biochemical and genetic characteristics support the assignment of 1AS2c^T to the genus *Streptomyces*, representing a novel species. The name *Streptomyces rhizosphaericola* sp. Nov. is proposed, with CMAA 1647^T (=NRRL B-65479^T =DSM 105299^T) be classified as the type strain.

Keywords: *Streptomyces rhizosphaericola* sp. nov.; Rhizosphere; Phenotypic and Morphological properties.

6.1. Introdução

O gênero *Streptomyces* foi proposto pela primeira vez por Waksman e Henrici (1943), para incluir uma nova actinobactéria com características de saprófito e, que formava esporos. Atualmente, este gênero engloba mais de 700 espécies (<http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesa.html>) e é o maior grupo bacteriano conhecido.

A característica acentuada do gênero, é a notável riqueza de vias biossintéticas que tem sido relacionadas na produção de cerca de 30% de todos os antibióticos conhecidos (Berdy, 2005). O potencial biotecnológico dos estreptomicetos tem sido aplicado em muitos campos de pesquisa e processos industriais e, portanto, diferentes programas de isolamento e pesquisa de *Streptomyces* são a cada vez mais frequentes, com o fim de, encontrar novos compostos bioativos (Goodfellow e Fiedler, 2010).

As classificações subgenéricas desse gênero, taxonomicamente complexo, foram esclarecidas com o uso de uma abordagem de taxonômica polifásica, aplicação de procedimentos genotípicos e fenotípicos (Stackebrandt et al., 2002). Estes procedimentos foram aplicados com sucesso na correta designação de espécies de *Streptomyces* erradas (Rong e Huang, 2014) e, na circunscrição de novas espécies isoladas de fontes ambientais (Silva et al., 2016a).

Durante investigações sobre a biodiversidade do solo do Cerrado brasileiro, uma nova linhagem de *Streptomyces* (1AS2c), foi recuperada da rizosfera de grãos de trigo. Este isolado foi efetivamente ativo contra o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. O objetivo do presente estudo foi estabelecer a posição taxonômica do isolado 1AS2c. Com base em uma combinação de procedimentos genotípicos e fenotípicos, o isolado 1AS2c pode ser reconhecido como uma nova espécie do gênero *Streptomyces*, para a qual é proposto o nome de *Streptomyces rhizosphaericola* sp. nov.

6.2. Materiais e Métodos

6.2.1. Organismos e condições de crescimento

O isolado 1AS2c^T foi obtido da rizosfera de trigo (*Triticum aestivum*) e cultivado em meio Glucose-Extrato de levedura-Ágar (GY), a 28°C, por duas semanas, posteriormente foram

realizadas purificações no meio ISP-2 (Shirling e Gottlieb 1966). A actinobactéria foi mantida, a 4°C, esporos suspensos em 15% (v/v) de glicerol foram preservados a -80°C. O isolado foi depositado na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) de Embrapa - Meio Ambiente com o código CMAA 1647^T.

6.2.2. Caracterização Morfológica, Fenotípica e quimiotaxonômica

A biomassa para as análises quimiotaxonômicas e moleculares foi obtida pelo cultivo do isolado em caldo de cultivo glicose extrato de levedura (GY) (Gordon e Mihm, 1962). O isolado foi crescido por 5 dias, a 28°C, sob agitação (140 rpm). A biomassa foi separada do meio por centrifugação e lavada duas vezes com água destilada estéril. A fim de determinar as características de crescimento do isolado, o mesmo foi cultivado nos meios do *International Streptomyces Project* (ISP) segundo, Shirling e Gottlieb (1966), a 28°C por duas semanas. A sensibilidade a antibióticos, tolerância a pH e NaCl, assim como a diferentes temperaturas foram testados em meio GY. O arranjo das hifas e ornamentação de esporos do isolado 1AS2c^T foi observado em meio aveia, após incubação a 28°C por duas semanas e, posteriormente observadas no microscópio eletrônico de varredura MEV (*Cambridge Stereoscan 240 instrument*), com as amostras desidratadas revestidas com ouro, como descrito por O'Donnell et al. (1993). A assimilação de várias fontes de carbono e a degradação de compostos foi verificada utilizando-se meio de cultura basal e GY, respectivamente (Gordon e Mihm 1962). As atividades enzimáticas do isolado foram determinadas utilizando-se o kit API ZYM (BioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante. Os lipídios polares e as menaquinonas predominantes foram avaliados segundo Minnikin et al. 1984. A composição de açúcar celular total foi determinada (Lechevalier e Lechevalier 1970). O perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos foi analisado após o crescimento do isolado em meio TSB a 28°C, por três dias. Os ácidos graxos foram metilados, separados e detectados por cromatografia gasosa (Hewlett Packard 6890) posteriormente analisada utilizando-se o sistema de identificação microbiana Sherlock (MIDI) (Sasser 2001). O resultado dos ácidos graxos metilados foi identificado e quantificado usando a base de dados TSBA (versão 6.19).

6.2.3. Caracterização filogenética

A extração de DNA foi realizada com o kit UltraClean® *Microbial DNA Isolation* (12224-250 MoBio, USA), e a amplificação e posterior sequenciamento do rRNA 16s foram obtidos seguindo o método de Kim et al (1996). A sequência gênica do rRNA 16s quase completa (1448 pb) foi alinhada manualmente pelo software MEGA 7 (Tamura et al. 2013). Linhagens tipo mais próximas foram comparadas pelo servidor EzTaxón-e (Kim et al 2012). A fim de inferir relações filogenéticas, árvores filogenéticas foram construídas utilizando três diferentes algoritmos: Neighbour-joining (Saitou e Nei, 1987), Maximum likelihood (Felsenstein 1981) e Maximum-parsimony (Fitch 1971) utilizando o programa Mega 7 (Tamura et al. 2013). Distâncias evolutivas foram calculadas pelo modelo de Kimura dois-parâmetros (Kimura 1980). Árvores evolutivas foram validadas pelo método bootstrap (Felsenstein 1985), utilizando 1000 réplicas no software MEGA 7. Como grupo externo para compor a raiz da árvore filogenética, foi selecionada a linhagem *Streptomyces albus* subsp. *albus* NRRL B-2365^T (DQ026669) e como grupo externo foi incluída a linhagem *Streptacidiphilus albus* DSM 41753^T (AF074415).

A análise de seis genes concatenados 16S rRNA, *atpD* (ATP sintase F1, subunidade beta), *gyrB* (DNA subunidade beta da girasse), *recA* (recombinasse A), *rpoB* (RNA polimerase subunidade beta) e *trpB* (triptofano B, subunidade beta); no total de 5416 nucleotídeos) foi conduzida como relatado por Gou et al. (2008) para a construção da árvore filogenética. O procedimento experimental e tratamento de dados para a análise de sequência multilocus (MLSA) foram baseados, com modificações, em procedimentos descritos (Labeda et al. 2014, 2016). Os dados MLSA foram analisados usando o algoritmo de Neighbour-joining (Saito e Nei, 1987), Distâncias evolutivas entre as sequências concatenadas foram estabelecidos utilizando o modelo Kimura dois-parâmetros (Kimura 1980). Linhagens avaliadas com distâncias evolutivas MLSA $\leq 0,007$ foram consideradas semelhantes, baseado no ponto de corte determinado por Rong e Huang (2012, 2014), dito valor corresponde a 70% de semelhança DNA: DNA, limite recomendado por Wayne et al (1987) para o delineamento de espécies de procaríotos. O conteúdo de G+C DNA (% mol) do isolado 1AS2c^T foi estimado utilizando o método de desnaturação térmica, como descrito por Gonzáles e Saiz-Jimenez (2002). Os valores da relação DNA-DNA (ΔT_m) entre o isolado 1AS2c^T e seus vizinhos filogenéticos mais próximos foram determinados utilizando o método fluorimétrico, descrito por Gonzáles e Saiz-Jimenez 2005. A temperatura ótima de renaturação (Tor) foi calculada utilizando $Tor = 0,51 (\%GC) + 47$. As

temperaturas de renaturação (T_m) para o DNA do isolado e as preparações de DNA híbrido foram comparadas, e as diferenças (ΔT_m), calculadas.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Avaliações morfológicas e fenotípicas

O isolado 1AS2c^T possui propriedades morfológicas características do gênero *Streptomyces*, crescendo nos meios ISP 1-5, 6 e 7. Pigmentos difusíveis foram observados nos meios ISP 2 e 3 (Tabela 8). A coloração da massa aérea observada manteve-se na série branca em todos os meios testados. A hifa aérea diferenciou-se em cadeias retas e flexíveis de superfície lisa, similar ao espécime mais próximo filogeneticamente *S. araujoniae* (ASBV-1^T) (Silva et al. 2013) (Figura 23). O isolado 1AS2c^T pode crescer em temperaturas entre 15 – 37°C (ótima de 28°C), pH entre 4 – 10 (ótimo 7) e pode tolerar concentrações de NaCl de até 7%. O isolado consegue degradar ácido úrico, caseína, gelatina, quitina, amido, butirina, xantina, xylana, Tween 20, 40, 60 e 80, mas não pectina. A capacidade do isolado 1AS2c^T de utilizar diferentes fontes de carbono foi testada em meio ágar basal, e mostrou bom crescimento em adonitol, α -Lactose, D-celobiose, citrato, D-arabinose, D-lactose, D-maltose, D-manose, dextrina, glicogênio, guanina, hipoxantina, L-asparagina, L-histidina, L-lisina, L-valina, meso-eritritol e D-sorbitol, porém não consegue utilizar manitol, mio-isonitol e dulcitol como únicas fontes de carbono. O perfil enzimático (ApiZYM) do isolado evidenciou uma produção positiva de fosfatase alcalina, esterase (C4), esterase lipase, leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina, α -quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-fosfohidrolase, β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase e N-acetil- β -glucosaminidase. Considerando as linhagens tipo mais proximamente relacionadas, o isolado 1AS2c^T pode ser claramente diferenciado de *S. cavourensis* (NBRC 13026^T), *S. albolongus* (NBRC 13465^T) e *S. araujoniae* fenotipicamente. Dados detalhados sobre as propriedades fisiológicas de 1AS2c^T em comparação as linhagens tipo mais proximamente relacionadas estão presentes na Tabela 9.

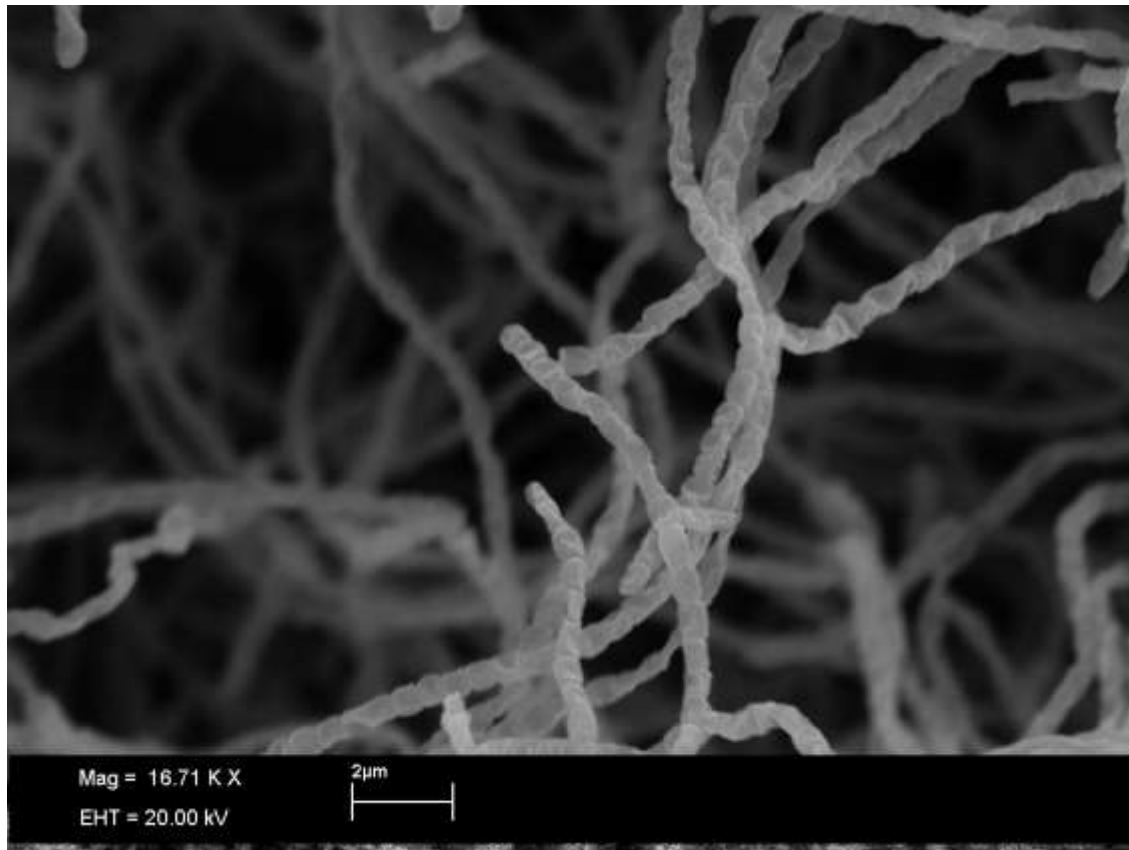


Figura 23. Micrografia eletrônica de varredura do isolado 1AS2c^T, crescido em meio de aveia, a 28°C, durante três semanas.

6.3.2. Filogenia

A sequência parcial de rRNA 16S do isolado 1AS2c^T (1448 pb) foi determinada e depositada no banco de dados GenBank como MF547408. A identificação foi feita utilizando o servidor EzTaxón, revelando que o isolado 1AS2c^T pertence ao gênero *Streptomyces* e demonstrou baixa similaridade da sequência do gene rRNA 16S com linhagem tipo *Streptomyces cavourensis* NBRC 13026^T (98,17 %). Descobriu-se que o isolado 1AS2c^T forma um ramo distinto bem delineado na árvore do gene de rRNA 16S, juntamente com *S. cavourensis* NBRC 13026^T, *S. albolongus* NBRC 13465^T e *S. araujoniae* ASBV-1^T. Esta relação foi sustentada por todos os algoritmos evolutivos com um alto valor de bootstrap (Figura 24).

O conteúdo de DNA G-C do isolado 1AS2c^T foi de 68,2% mol. Valores da relação DNA:DNA (ΔT_m) entre o isolado 1AS2c^T e seus três vizinhos filogeneticamente mais próximos *S. cavourensis* (NBRC 13026^T), *S. albolongus* (NBRC 13465^T) e *S. araujoniae* (ASBV-1^T) foram 56.0±0.4, 62.5±0.3, e 63.0±0,1, respectivamente. Esses valores estão abaixo do ponto de corte de 70% recomendado para a delimitação de novas espécies bacterianas (Wayne et al. 1987). Usando o MLSA, foi possível clarificar as relações entre os estreptomicetos mais proximamente relacionados, em razão do forte sinal filogenético fornecido por sequências parciais de uma única cópia de genes constitutivos (housekeeping genes) (Rong e Huang 2012, 2014; Labeda et al., 2017). Neste estudo, por meio da análise MLSA, as relações encontradas entre o isolado 1AS2c^T e suas linhagens tipo mais próximas estão mostradas na Figura 25 e Tabela 10. O isolado é proximamente relacionado com *S. araujoniae* (ASBV-1^T) e *S. cavourensis* (NBRC 13026^T), relações que estão apoiadas por um valor de bootstrap de 100 (Figura 25). O isolado 1AS2c^T mostrou ter distâncias evolutivas usando a análise MLSA maiores que 0,007 com todas as linhagens avaliadas, (Figura 25), indicando que ele forma o núcleo de uma nova espécie de *Streptomyces* (Wayne et al 1987).

Tabela 9. Características fenotípicas diferenciais do isolado 1AS2c^T e *S. cavourensis* (NBRC 13026^T), *S. albolongus* (NBRC 13465^T) e *S. araujoniae* (ASBV-1^T).

Teste Fenotípico	Isolado 1AS2c^T	<i>S. cavourensis</i> (NBRC 13026^T)	<i>S. albolongus</i> (NBRC 13465^T)	<i>S. araujoniae</i> (ASBV-1^T)
Crescimento a:				
Na Cl (%)				
3	+	+	-	+
5	+	-	-	-
7	+	-	-	-
Temperatura (°C)				
37	+	+	-	+
Resistência a antibióticos (µg.mL⁻¹)				
Rifampicina (10)	-	+	+	+
Estreptomicina (16)	+	-	+	+
Testes de degradação				
Ácido Úrico	+	+	-	+
Guanina	+	-	-	-
Hipoxantina	+	+	-	-
Pectina	-	+	+	+
Butirina	+	+	-	-
Tween 20	+	-	+	-
Tween 40	+	-	+	-
Tween 60	+	-	+	-
Tween 80	+	-	+	-
Xantina	+	+	-	+
Xilana	+	+	-	+
Utilização de fonte de carbono				
Adonitol	+	-	-	+
Manitol	-	+	-	+
Meso-Eritritol	+	-	-	+
Meso-Inositol	-	+	-	+
Sorbitol	+	+	-	+
Teste ApiZYM				
Fosfatase alcalina	+	+	-	+
Esterase (C4)	+	+	-	+
Esterase Lipase (C8)	+	-	+	+
Tripsina	+	-	-	-
α-quimiotripsina	+	+	-	+
Fosfatase ácida	+	-	+	+
Naftol-fosfohidrolase	+	-	+	-
β - galactosidase	+	-	-	-
α - glucosidase	+	+	-	+
β - glucosidase	+	+	-	+
N – acetil – β glucosaminidase	+	-	-	-

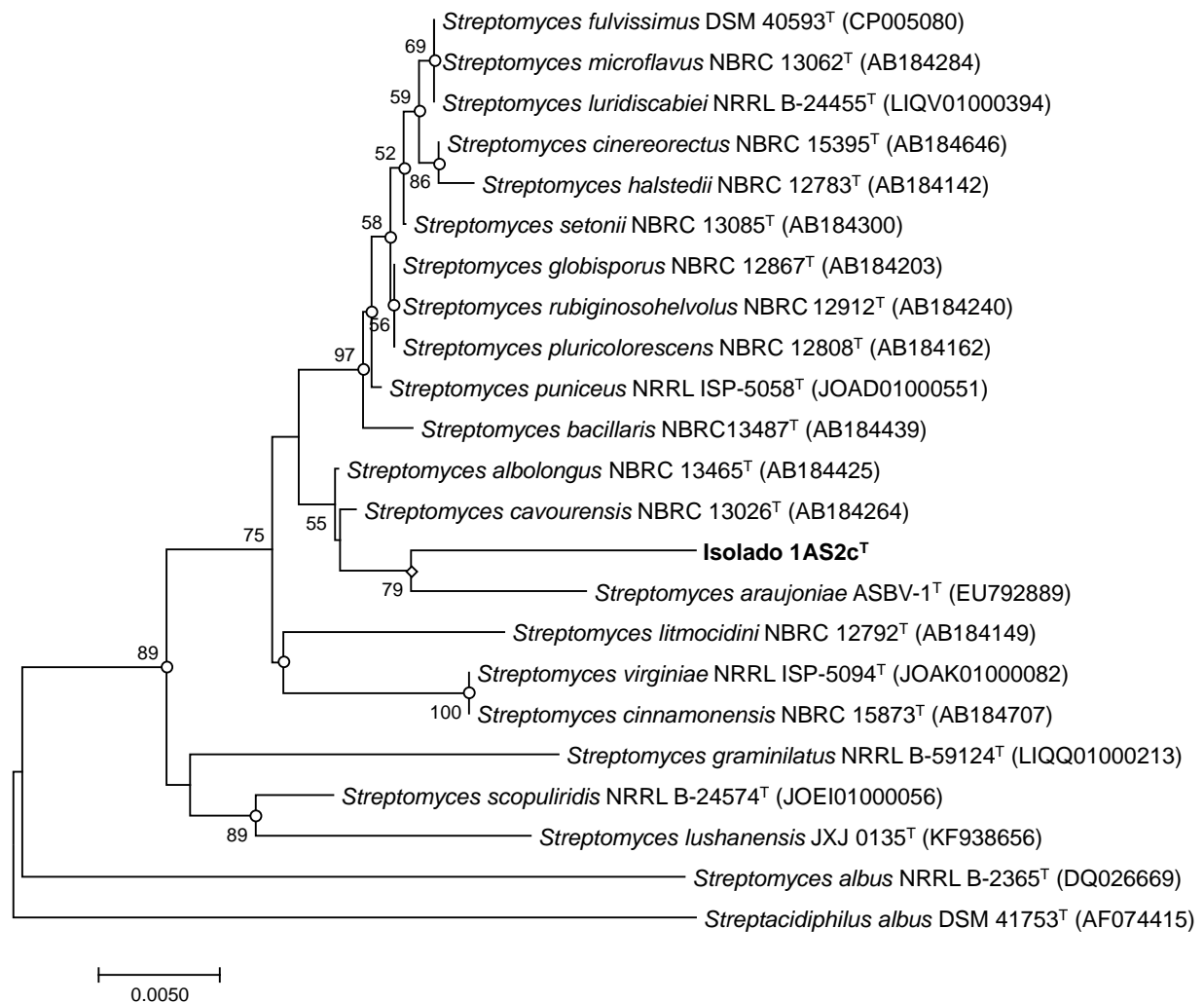


Figura 24. Relações filogenéticas entre a linhagem 1AS2c^T e as linhagens tipo do gênero *Streptomyces* mais próximas baseadas no método evolutivo de *Neighbour-Joining* baseado na sequência parcial do gene rRNA 16S (1446 nucleotídeos). Círculo branco representa ramo aparece em os algoritmos evolutivos *Neighbour-joining*, *maximum-likelihood* e *maximum-parsimony*, losango branco representa ramo aparece usando os algoritmos de *Neighbour-joining*, *maximum-likelihood*. Porcentagens nos nodos representam os níveis de suporte usando um bootstrap de 1000.

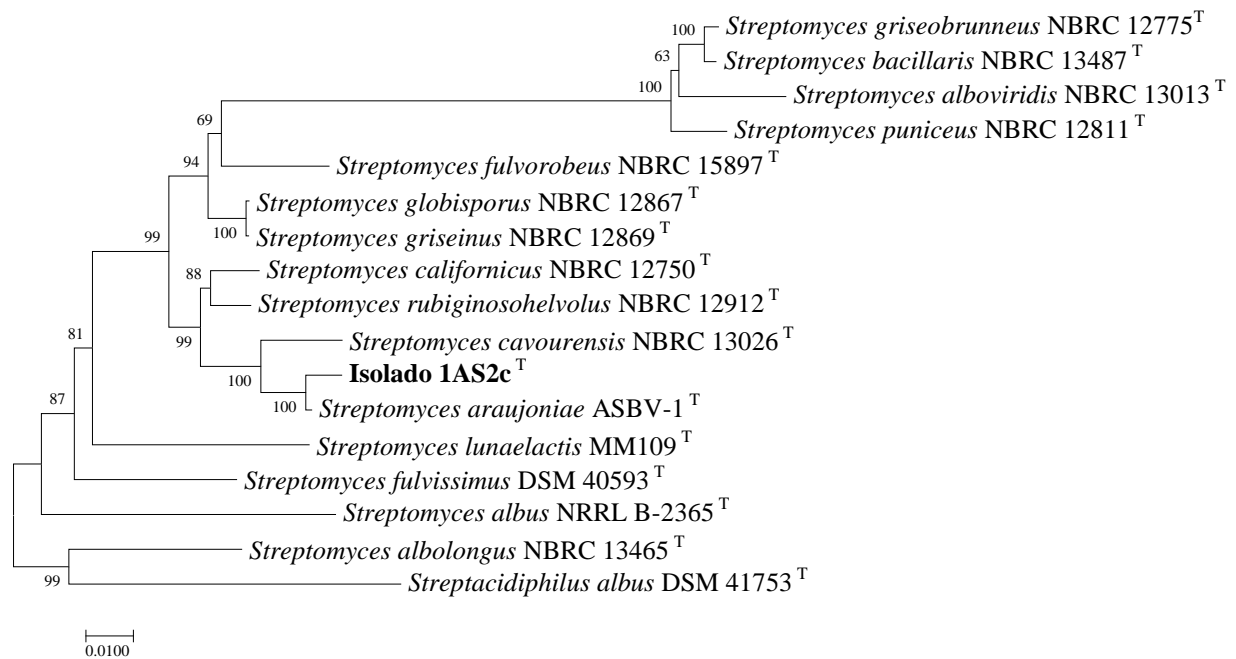


Figura 25. Relações filogenéticas da linhagem 1AS2c^T e as linhagens tipo do gênero *Streptomyces* mais próximos usando uma árvore concatenada com a sequência parcial dos genes constitutivos (housekeeping) rRNA 16S *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB*, utilizando o método da máxima maximum-likelihood, baseado no modelo General Time Reversible. Porcentagens nos nodos representam os níveis de suporte usando um bootstrap de 1000.

Tabela 10. Distâncias evolutivas usando a análise MLSA do isolado 1AS2c^T e das linhagens tipo de espécies de *Streptomyces* filogeneticamente mais próximas.

Linhagem	Distância MLSA (Kimura2 parâmetros)																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 Isolado 1AS2c ^(T)	-																
2 <i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC 13026 ^(T)	0,033																
3 <i>Streptomyces albolongus</i> NBRC 13465 ^(T)	0,124	0,119															
4 <i>Streptomyces araujoniae</i> ASBV-1 ^(T)	0,009	0,028	0,117														
5 <i>Streptomyces californicus</i> NBRC 12750 ^(T)	0,038	0,044	0,106	0,032													
6 <i>Streptomyces puniceus</i> NBRC 12811 ^(T)	0,162	0,157	0,178	0,154	0,117												
7 <i>Streptomyces griseobrunneus</i> NBRC 12775 ^(T)	0,145	0,140	0,181	0,138	0,141	0,024											
8 <i>Streptomyces bacillaris</i> NBRC 13487 ^(T)	0,148	0,141	0,183	0,140	0,141	0,023	0,005										
9 <i>Streptomyces fulvorobeus</i> NBRC 15897 ^(T)	0,074	0,071	0,101	0,068	0,056	0,130	0,133	0,131									
10 <i>Streptomyces globisporus</i> NBRC_12867 ^(T)	0,059	0,055	0,092	0,053	0,037	0,115	0,121	0,119	0,035								
11 <i>Streptomyces lunaelactis</i> MM109 ^(T)	0,084	0,092	0,112	0,078	0,072	0,187	0,184	0,184	0,095	0,088							
12 <i>Streptomyces fulvissimus</i> DSM 40593 ^(T)	0,098	0,095	0,089	0,091	0,088	0,159	0,155	0,152	0,068	0,069	0,083						
13 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> NBRC 12912 ^(T)	0,038	0,044	0,111	0,032	0,019	0,139	0,143	0,142	0,052	0,025	0,069	0,088					
14 <i>Streptomyces alboviridis</i> NBRC 13013 ^(T)	0,174	0,169	0,196	0,166	0,154	0,034	0,031	0,030	0,133	0,125	0,200	0,166	0,147				
15 <i>Streptomyces griseinus</i> NBRC 12869 ^(T)	0,059	0,054	0,093	0,052	0,037	0,115	0,121	0,119	0,035	0,001	0,087	0,068	0,025	0,125			
16 <i>Streptomyces albus</i> NRRL B-2365 ^(T)	0,130	0,129	0,119	0,123	0,123	0,194	0,185	0,183	0,099	0,102	0,129	0,098	0,118	0,200	0,102		
17 <i>Streptacidiphilus albus</i> DSM 41753 ^(T)	0,135	0,144	0,106	0,129	0,124	0,246	0,240	0,240	0,154	0,149	0,120	0,143	0,123	0,260	0,149	0,145	-

6.3.3. Quimiotaxonomia

As propriedades quimiotaxonômicas do isolado 1AS2c^T foram consistentes com sua classificação no gênero *Streptomyces* (Kämpfer et al., 2012). Avaliação de marcadores químicos conhecidos para membros do gênero *Streptomyces* foram utilizados (Kämpfer 2012, Labeda et al. 2012). O perfil de lipídio polar evidenciou a presença de difosfatidilglicerol, fatidilglicerol, fosfatidilmetiletanolamina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol manosídeo e um lipídio não identificado. Os maiores isoprenos identificados foram o octahidrogenado, com nove isoprenóides MK-9_(H8), não hidrogenado com nove MK-9_(H0) e oito isoprenos não hidrogenados MK-8_(H0) (34.43, 20.17 e 22.15%, respectivamente). A análise de açúcares de parede celular revelou a predominância de glucose, manose e xilose. O perfil de ácidos graxos do isolado 1AS2c^T mostrou-se consistir em maiores proporções de (>10%) Iso-C_{14:0} (15.65%), Anteiso-C_{15:0} (12.95%), Iso-C_{16:0} (39.45%), e baixas proporções de (<10%) Iso-C_{15:0} (4.58 %), Iso-C_{16:1 H} (3.54 %), C_{16:0} (3.14 %), Anteiso-C_{17:1 ω9c} (7.22 %), Iso-C_{17:0} (1.6), Anteiso-C_{17:0} (4.94), Ciclo-C_{17:0} (2.43), Iso-C_{18:1 H} (0.82).

6.3.4. Descrição do *Streptomyces rhizosphaericola*

Streptomyces rhizosphaericola (rhi.zos.phae.ri'co.la. N.L. fem. n. *rhizosphaera*, the rhizosphere; L. suff. *-cola* (from L. n. *incola*), inhabitant, dweller; N.L. part. adj. *rhizosphaericola*, inhabiting the rhizosphere).

Actinobactéria aeróbica, gram-positiva, que forma um substrato micelial amplamente ramificado. A hifa aérea é bem desenvolvida em cadeias retas-flexíveis, com diâmetro médio dos esporos elípticos de 0,7 – 0,9 x 0,9 – 1,1 μm com superfície lisa. Cresce a 15 – 37°C (ótimo de 28 – 30°C), e em pH 4,0 a 10,0 (ótimo 7,0) e tolerante a 7,0% de Na Cl. Cresce em adonitol, arabinose, α-Lactose, dextrina, glicogênio, maltose, meso-eritridol, sorbitol e xilose como únicas fontes de carbono para energia e crescimento, porém, não cresceu na presença de D-frutose, D-manitol ou mio-inositol no meio. Os principais ácidos graxos do isolado 1AS2c são Iso-C_{14:0} (15.65%), Anteiso-C_{15:0} (12.95%) e Iso-C_{16:0} (39.45%). O conteúdo de G+C do DNA do isolado 1AS2c é 68,2 % mol. Produz Fosfatase alcalina, Esterase (C4), Esterase lipase, Leucina arilamidase, Valina arilamidase, Cisteína arilamidase, Tripsina, α-quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-fosfohidrolase, β-galactosidase, α-glucosidase, β-glucosidase e N-acetil-β-glucosaminidase. Propriedades fenotípicas e quimiotaxonômicas

adicionais estão resumidas nas Tabelas 8 e 9, essas propriedades quimiotaxonômicas são típicas de membros do gênero *Streptomyces*.

A linhagem tipo 1AS2c - CMAA 1647^T foi isolada de rizosfera de trigo. A descrição da espécie foi baseada em um único isolado e, assim, serve como a descrição de uma linhagem tipo. O número de acesso da sequência do gene rRNA 16S da *Streptomyces rhizosphaericola* sp. nov. 1AS2c - CMAA 1647^T no GenBank é MF547408.

6.4. Conclusão

Levando em consideração todas às análises feitas, o isolado 1AS2c = CMMA 1679, pode ser considerada como uma nova espécie, por tanto, o nome proposto e: *Streptomyces rhizosphaericola*.

REFERÊNCIAS

- Bérdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, 58(1), 1–26.
- Boer WD, Gunnewiek PJAK, Kowalchuk GA and Veen VAJ. (2001) Growth of Chitinolytic Dune Soil B-subclass Proteobacteria in Response to Invading Fungal Hyphae. **Applied and Environmental Microbiology**. 67:8; 3358-3362.
- Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **J Mol Evol** 17, 368-376.
- Felsenstein J. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. **The American Naturalist**. Vol 125, No1, 1-15.
- Fitch WM. (1971). Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 20, 406-416.
- Gooday GW. (1990) Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. **Biodegradation** 1:177–190.
- Goodfellow M, Fiedler HP. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie van Leeuwenhoek**. 98:119–142.
- Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C. (2002). A fluorimetric method for the estimation of G?C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. **Environ Microbiol** 4:770–773.
- Gonzalez J.M. and Saiz-Jimenez C. (2005). A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. **Extremophiles** 9, 75–79.
- Gordon RE, Mihm JM. (1962). The type species of the genus *Nocardia*. **J Gen Microbiol** 27:1–10.
- Guo Y, Zheng W, Rong X, Huang Y. (2008). A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. **Int J Syst Evol Microbiol** 58, 149–159.

- Kämpfer P. (2012). Genus I. *Streptomyces*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, **the Actinobacteria**, vol 5, 2nd edn. Springer, New York, pp 1455–1462.
- Kim D, Chun J, Sahin N, Hah YC, Goodfellow M. (1996) Analysis of thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S rRNA ribosomal DNA sequence comparisons. **Int J Syst Bacteriol** 46:581–587
- Kim O-S, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **Int J Syst Evol Microbiol** 62, 716–721.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol** 16 (2) 111 – 20.
- Labeda DP, Goodfellow M, Brown R, Ward AC, Lanoot B, Vancanneyt M, Swings J, Kim SB, Liu Z, Chun J, Tamura T, Oguchi A, Kikuchi T, Kikuchi H, Nishii T, Tsuji K, Tase A, Takahashi M, Sakane T, Suzuki KI, Hatano K, Yamaguchi A. (2012). Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. **Antonie Van Leeuwenhoek** 101:73–104.
- Labeda DP, Doroghazi JR, Ju KS, Metcalf WW. (2014). Taxonomic evaluation of *Streptomyces albus* and related species using multilocus sequence analysis and proposals to emend the description of *Streptomyces albus* and describe *Streptomyces pathocidini* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** 64:894–900.
- Labeda DP, Rong X, Huang Y, Doroghazi JR, Ju KS, Metcalf WW. (2016). Taxonomic evaluation of species of the *Streptomyces hirsutus* clade using multi-locus sequence analysis and proposals to reclarify several species in this clade. **Int J Syst Evol Microbiol** 66:2444–2450.
- Lechevalier MP, Lechevalier H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **Int J Syst Bacteriol** 20:435–443
- Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M, Schaal A, Parlett JH, (1984). A integrated procedure for the extraction os the bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. **Journal of Microbiological Methods**. 2: 233–241.

- Rong X, Huang Y. (2012). Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. **Syst Appl Microbiol** 35:7–18.
- Rong X, Huang Y. (2014). Multi-locus sequence analysis: taking prokaryotic systematics to the next level. **Methods Microbiol** 41:221–251.
- Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molec Biol and Evol** 4, 406-425.
- Sasser M. (2001). Technical Note # 101 Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids (February), 1–6.
- Silva LJ, Taketani RG, Melo IS, Goodfellow M, Zucchi TD. (2013). *Streptomyces araujoniae* sp. nov.: an actinomycete isolated from a potato tubercle. **Antonie van Leeuwenhoek** 103:1235–1244.
- Silva FSP, Souza TD, Zucchi TD, Pansa CC, Vasconcellos RLdeV, Crevelin EJ, Moraes LAB, Melo IS. (2016)a. *Streptomyces atlanticus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from marine sponge *Aplysina fulva* (Pallas, 1766). **Antonie van Leeuwenhoek** 109:1467–1474.
- Silva MS., Sales AN, Magalhães-Guedes KT, Dias DR, Schwan RF. (2016)b. Brazilian Cerrado Soil Actinobacteria Ecology. **BioMed Research International** Vol 2013, Article ID 503805, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/503805>.
- Shirling EB, Gottlieb D, (1966). Methods for characterization of streptomyces species. **Int J Syst Evol Microbiol** 16:313–340.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont P, Kampfer P. et al. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **Int J Syst Evol Microbiol**. 52:1043-1047.
- Stewart A, Brownbridge M, Hill RA, Jackson TA. (2010) Utilizing soil Microbes for biocontrol, in Soil Microbiology and Sustainable Crop Production. XX
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Mol Biol Evol** 30 (12), 2725–2729.

Waksman SA, Henrici AT. (1943) The nomenclature and classification of the actinomycetes. **J. Bacteriol** 1943; 46:337–341.

Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR. (1987). Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **Int J Syst Evol Microbiol** 37, 463–464.

Zhao S, Ye L, Liu C, Abagana AY, Zheng W, Sun P, Li J, Xiang W, Wang X. (2017). *Streptomyces gamaensis* sp. nov., a novel actinomycete with antifungal activity isolated from soil in Gama, Chad. **Antonie van Leeuwenhoek**, 110:471–477.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ❖ Com a necessidade de incrementar a produção agrícola e diminuir o uso de agrotóxicos no Brasil, resulta urgente, desenvolver pesquisas na identificação, caracterização e aplicação de agentes biológicos, que favoreçam o uso destas ferramentas no manejo integrado de pragas e doenças
- ❖ As características genéticas e fenotípicas das Actinobactérias acessadas neste estudo, podem ser exploradas em diversas aplicações na área agrícola, porém, estudos posteriores de viabilidade econômica e desenvolvimento de produtos e formulação devem ser realizados com o intuito de oferecer novas tecnologias no agronegócio do país
- ❖ Resulta necessário, estabelecer políticas governamentais sólidas que permitam a implementação de “novas” tecnologias no setor agrícola
- ❖ É o *Streptomyces* o protagonista de uma nova “revolução” na setor agrícola, como foi anteriormente no setor farmacêutico e industrial ?

ANEXOS

Anexo A

Descrição dos locais de amostragem das Actinobactérias usadas neste estúdio

Bioma	Estado	Local	Ponto de coleta	Localização geográfica	Amostra	Código
Mata Atlântica (Manguezal)	São Paulo	Cananeia	1	S 25° 05' 1,87"; W 47° 57' 41,7"	Sedimento marinho	Can V1
			2	S 25° 05' 6,88"; W 47° 57' 41,42"	Sedimento marinho	Can V2
			3	S 25° 05' 12,61"; W 47° 57' 41,21"	Sedimento marinho	Can V3
	Bertioga	1	S 23° 53' 50,4"; W 46° 12' 30,6"	Sedimento marinho	Bc V1	
		2	S 23° 53' 42,8"; W 46° 12' 30,1"	Sedimento marinho	Bc V2	
		3	S 23° 53' 41,1"; W 46° 12' 32,3"	Sedimento marinho	Bc V3	
Cerrado	São Paulo	Palmital	1	S 22° 47' 30"; W 50° 12' 18"	Rizosfera de <i>Triticum aestivum</i>	AS, BS
	Brasília D.F.	Planaltina	1	S 15° 36' ; W 47° 42'	Rizosfera de <i>Triticum aestivum</i>	AR, BR
Caatinga	Pernambuco	Jutai	5	S 08° 36' 13,17"; W 40° 13' 4,18"	Rizosfera de <i>Eritrina volutina</i>	Caat P5
	Pernambuco	Petrolina	8	S 09° 03' 35,62"; W 40° 18' 41,88"	Rizosfera de <i>Mimosa artemisiana</i>	Caat P8

Anexo B

Lista de meios usados neste estúdio

Batata Dextrose Ágar (BDA)

* Caldo de batata -----	200 mL
Água destilada -----	800 mL
Dextrose -----	20,0 g
Ágar -----	16,0 g

Batata Dextrose Ágar (BDA)

* Caldo de batata -----	200 mL
Água destilada -----	800 mL
Dextrose -----	20,0 g

* Para cada quilograma de batata descascada, adicionar 1000 mL de água destilada. O conteúdo deve ser fervido durante 30 minutos. Após este procedimento, filtrar em gaze estéril e completar o volume final à 1000 mL através da adição de água destilada. O caldo deve ser particionado em volume de 100 mL e mantido a -20 °C.

Ágar Água (AA)

Água destilada -----	1000 mL
Ágar -----	16,0 g

Caldo Extrato de Levedura (GY)

Extrato de levedura -----	10,0 g
Glicose -----	10,0 g
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	7,2±0,2

Caldo Triptona de Soja (TSB)

Peptona de caseína -----	17,0 g
--------------------------	--------

Peptona de soja -----	3 g
Cloreto de sódio (NaCl) -----	5 g
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄)-- -----	2,5 g
Glicose -----	2,5 g
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	7,3±0,2
Ágar -----	18,0 g

Caldo Triptona de Soja + Agar (TSA)

Peptona de caseína -----	17,0 g
Peptona de soja -----	3 g
Cloreto de sódio (NaCl) -----	5 g
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄)-- -----	2,5 g
Glicose -----	2,5 g
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	7,3±0,2

Agar Aveia (AA)

Água destilada -----	1000 mL
Ágar -----	18,0 g
Aveia -----	20,0 g

Meio National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP)

Água destilada -----	1000 mL
Ágar -----	18,0 g
Glicose -----	10,0 g
Cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O) -----	5,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O) -----	0,25 g
Cloreto de Potássio (KCL) -----	0,2 g
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄) -----	0,1 g
Fosfato de cálcio (Ca ₃ (PO ₄)) -----	5,0 g

Phytate Specific Media (PSM)

Água destilada -----	1000 mL
Ágar -----	18,0 g
Glicose -----	15,0 g
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄) -----	5 g
Cloreto de sódio (NaCl) -----	0,1 g
Cloreto de Potássio (KCL) -----	0,5 g
Sulfato de ferro II (FeSO ₄) -----	0,1 g
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O) -----	0,1 g
Cloreto de Cálcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O) -----	0,1 g
Sulfato de Manganês (MnSO ₄)-----	0,01 g
Fitato de Cálcio (C ₆ H ₁₈ O ₂₄ P ₆) -----	5 g

NBRIP modificado contendo Fosfato de Rocha (PR)

Água destilada -----	1000 mL
Ágar -----	18,0 g
Glicose -----	10,0 g

Cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	-----5,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	-----0,25 g
Cloreto de Potássio (KCL)	-----0,2 g
Sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$)	-----0,1 g
Fosfato de Rocha ($CO_3 (PO_4)$)	-----5,0 g

International Streptomyces Project 1; ISP 1 (Extrato de Triptona Ágar)

Triptona bacteriológica	----- 5,0 g
Extrato de levedura bacteriológica	----- 3,0 g Ágar
	----- 15,0 g
Água destilada	-----1000 mL
pH	----- 7,0 - 7,2

International Streptomyces Project 2; ISP 2 (Extrato de Malte Ágar)

Extrato de levedura	----- 4,0 g
Extrato de malte	----- 10,0 g
Dextrose	----- 4,0 g
Ágar	-----20,0 g
Água destilada	-----1000 mL
pH	-----7,3

International Streptomyces Project 3; ISP 3 (Extrato de Aveia Ágar)

**** Filtrado de aveia	-----1000 mL
***** Solução traço de sais	----- 1,0 mL
Ágar	----- 18,0 g
pH	-----7,2

**** Para o preparo do filtrado deve-se adicionar 20,0 g de aveia em 1000 mL de água destilada. Após 20 minutos de fervura, o caldo deve ser filtrado em gaze estéril. O volume final deve ser ajustado para 1000 mL, por meio da adição de água destilada.

***** Solução traço de sais

FeSO ₄ .7H ₂ O	----- 0,1 g
MnCl ₄ .4H ₂ O	----- 0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	----- 0,1 g
Água destilada	----- 100 mL

A solução deve ser autoclavada durante 20 minutos a 121 °C e armazenada a 4°C.

International Streptomyces Project 4; ISP 4 (Meio de Amido com Sais Inorgânicos)

Água destilada	----- 500 mL
K ₂ HPO ₄	----- 1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	----- 1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	----- 2,0 g
NaCl	----- 1,0 g
CaCO ₃	----- 2,0 g
***** Solução de amido	----- 500 mL
pH	----- 7,0 - 7,4

Agar ----- 20,0 g

***** Para o preparo da solução de amido deve-se adicionar 10 g de amido em 500 mL de água destilada. A solução deve ser homogeneizada por meio de aquecimento.

International *Streptomyces* Project 5; ISP 5 (Meio Glicerol/Asparagina)

L- asparagina ----- 1,0 g
 Glicerol ----- 10,0 g
 KH₂PO₄ ----- 1,0 g
 *** Solução traço de sais ----- 1,0 mL
 Ágar ----- 15,0 g
 Água destilada ----- 1000 mL
 pH-----6,8±0,2

International *Streptomyces* Project 6; ISP 6 (Extrato de Peptona Férrica)

Peptona bacteriológica férrica ágar ----- 36,0 g
 Extrato de levedura bacteriológica ----- 1,0 g
 Água destilada ----- 1000 mL
 pH -----7,0±0,2

International *Streptomyces* Project 7; ISP 7 (Meio de Tirosina)

Glicerol ----- 15,0 g
 L-tirosina ----- 0,5 g
 L-asparagina ----- 1,0 g
 K₂HPO₄ ----- 0,5 g
 MgSO₄.7H₂O ----- 0,5 g
 NaCl ----- 0,5 g
 FeSO₄.7H₂O ----- 0,01 g
 Água destilada ----- 1000 mL
 *** Solução traço de sais ----- 1,0 mL
 Agar ----- 20,0 g
 pH ----- 7,2 - 7,4

International *Streptomyces* Project 9 (Meio Basal de Sais Minerai para degradação de carbono)

(NH₄)₂SO₄ ----- 2,64 g
 KH₂PO₄ ----- 2,38 g
 K₂HPO₄.3H₂O ----- 5,65 g
 MgSO₄.7H₂O ----- 1,0 g
 ***** Solução traço de sais Pridham e Gottlieb ----- 1,0 mL Ágar
 ----- 15,0 g
 Água destilada ----- 1000 mL
 pH -----6,8±7,0

***** Solução traço de sais Pridham e Gottlieb

CuSO₄.5H₂O ----- 0,64 g
 FeSO₄.7H₂O ----- 0,11 g

MnCl ₂ .4H ₂ O -----	0,79 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O -----	0,15 g
Água destilada -----	100 mL

As fontes de carbono a serem avaliadas devem ser dissolvidas em água destilada e autoclavada separadamente. A solução deve ser incorporada ao meio de cultivo de forma a obter a concentração desejada.

Todos os meios foram autoclavados durante 21 minutos a 121°C.