

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**BIANCA ALLAMA MASLAK**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Streptomyces* sp. FRENTE A DIFERENTES  
ISOLADOS DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.**

**Porto Alegre**

**2018**

**BIANCA ALLAMA MASLAK**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Streptomyces* sp. FRENTE A DIFERENTES  
ISOLADOS DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.**

Trabalho de Conclusão de curso na forma de artigo  
como requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli T. Van Der Sand

**Porto Alegre**

**2018**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Sueli T. Van Der Sand, a todos os colegas do laboratório de Microbiologia Aplicada, aos meus pais e amigos por todo apoio. Muito obrigada a todos.

## RESUMO

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, filamentosas e predominantemente aeróbias. No ambiente, são encontradas principalmente no solo, onde compõem uma das maiores comunidades microbianas. Dentre estes microrganismos, o gênero *Streptomyces* destaca-se por produzir compostos de metabolismo secundário com potencial antimicrobiano. Os fungos fitopatogênicos representam um grande desafio, principalmente para a agricultura, uma vez que são difíceis de serem eliminados. É comum a utilização de fungicidas para este caso, o que gera grandes impactos ambientais, além do aumento da resistência do fitopatógeno. Sendo assim, faz-se necessário um sistema de controle alternativo, onde o controle biológico representa uma estratégia com potencial. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica produzida pelo isolado *Streptomyces* sp. 8S frente a diferentes isolados de fungos fitopatogênicos. A atividade antifúngica do isolado de *Streptomyces* sp. 8S foi avaliada através do método de dupla-camada. A partir do Índice de Antibiose (IA) calculado, foi possível observar que o isolado de *Streptomyces* sp. 8S foi eficiente contra os isolados dos fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum* e *Drechslera tritici-repentis* testados. O maior IA (3,10) foi observado para o isolado 98034P(1) de *B. sorokiniana*. Segue a importância de se realizar novos estudos com outros microrganismos ainda não testados.

**Palavras-chaves:** *Streptomyces* sp., fungos fitopatogênicos, antifúngico.

## ABSTRACT

### ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Streptomyces* sp. AGAINST DIFFERENT ISOLATES OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI.

Actinobacteria are Gram-positive, filamentous and predominantly aerobic bacteria. In the environment, they are found mainly in the soil, where they make up one of the largest microbial communities. Among these microorganisms, the genus *Streptomyces* stands out for producing secondary metabolism compounds with potential antimicrobial. Phytopathogenic fungi present a major challenge, especially for agriculture, since they are difficult to eliminate. In this case it is common the use of fungicides, which generates great environmental impacts, besides the increase of phytopathogen resistance. Thus, an alternative control system is necessary, where the biological control represents a strategy with great potential. Therefore, this study aimed to evaluate the antifungal activity produced by the isolate of *Streptomyces* sp. 8S against different isolates of phytopathogenic fungi. The antifungal activity of the *Streptomyces* 8S isolate was tested by the double-layer method. From the calculated Antibiose Index (AI), it was possible to observe that the *Streptomyces* 8S isolate was efficient against the phytopathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum* and *Drechslera tritici-repentis* tested. The highest value of the AI (3,10) was observed for isolate 98034P(1) of *B. sorokiniana*. It is important to carry out new studies with other microorganisms that have not yet been tested.

**Keywords:** *Streptomyces* sp., phytopathogenic fungi, antifungal.

## INTRODUÇÃO

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, filamentosas e predominantemente aeróbias. Estes microrganismos podem ser acidófilos ou alcalófilos. A grande maioria cresce em pH neutro. Alguns destes microrganismos são conhecidos por formar micélio no substrato e micélio aéreo em meios sólidos (Goodfellow, 2012). No ambiente, são encontrados principalmente no solo, onde compõem uma das maiores comunidades microbianas, participando da decomposição da matéria orgânica e de moléculas recalcitrantes. Podem ser encontrados também em ambientes aquáticos, incluindo habitats extremos. Alguns podem ser simbiontes, comensais, patógenos de plantas ou habitantes do trato gastrintestinal (Goodfellow, 2012).

O filo Actinobacteria é composto por microrganismos de morfologia bastante diversificada, variando desde cocos a micélios altamente diferenciados. A ordem Actinomycetales é composta por 63 gêneros e representa grande parte da população microbiana do solo. Estes microrganismos são geralmente divididos em dois grupos, os “actinomicetos nocardioformes”, caracterizados por apresentarem um micélio rudimentar seguido de fragmentação, e o outro grupo denominado “esporoactinomicetos”, os quais são caracterizados por exibirem uma rede de micélio aéreo bem desenvolvido, além da presença de esporos. Este último grupo engloba os gêneros *Streptomyces*, *Microbispora* e *Actinoplanes*, entre outros. Dentre estes microrganismos, o gênero *Streptomyces* se destaca por produzir um grande número de compostos de metabolismo secundário com potencial antimicrobiano. Segundo Watve *et al.* (2001), cerca de cento e cinquenta mil compostos antimicrobianos são encontrados no gênero *Streptomyces*. Vários compostos oriundos das actinobactérias já foram isolados e caracterizados e uma boa parte transformada em produto comercial para o tratamento de diversas doenças humanas, veterinárias e agrícolas. Entretanto, ainda há um grande número de novos compostos a serem descobertos.

As actinobactérias representam ainda um importante grupo da comunidade microbiana endofítica e rizosférica de diversas plantas. Sendo assim, este grupo de microrganismos é muito estudado pela possibilidade de ser utilizado no controle microbiológico, a partir da produção de compostos antimicrobianos entre outros metabólitos secundários, além da capacidade de interagir com as plantas e outras populações microbianas (Cao *et al.* 2004).

Os fungos fitopatogênicos representam um grande desafio para a agricultura, uma vez que são difíceis de serem eliminados. É comum a utilização de fungicidas para este caso, o que gera grandes impactos ambientais, além do aumento da resistência do fitopatógeno. Sendo assim, faz-se necessário um sistema de controle alternativo, onde o controle biológico representa uma estratégia com potencial. Dentre alguns dos fungos que causam doenças em plantas como o trigo, podemos citar *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum* e *Drechslera tritici-repentis*. *B. sorokiniana* é conhecido por afetar o trigo, causando moléstias como a mancha marrom ou helmintosporiose, ponta preta dos grãos, podridão comum da raiz e carvão do nó (Reis *et al.* 2001). Este fungo apresenta uma grande variabilidade fisiológica e morfológica, desta forma, dificultando o seu controle e ocasionando perdas significativas na produção de trigo (Feltrin *et al.* 2011). *F. graminearum* é conhecido por causar a doença chamada giberela nas culturas de trigo. A redução no rendimento e a contaminação com as micotoxinas de desoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV) são alguns dos danos causados por *F. graminearum* (Casa *et al.*, 2004; Del Ponte *et al.* 2012). A mancha amarela do trigo, causada por *D. tritici-repentis*, está relacionada a uma redução na taxa de fotossíntese da planta (Tonin, 2012).

Segundo Luz (2001), sementes que foram tratadas com bactérias biocontroladoras e infectadas com fungos fitopatogênicos como, *B. sorokiniana*, *F. graminearum*, *D. tritici-repentis* e *Stagonospora nodorum* apresentaram baixa ou nenhuma incidência desses

patógenos, obtendo um resultando semelhante ao das sementes que são tratadas com fungicidas.

Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica produzida pelo isolado *Streptomyces* sp. 8S frente os diferentes isolados de fungos fitopatogênicos *B. sorokiniana*, *F. graminearum* e *D. tritici-repentis*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolados**

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado o isolado *Streptomyces* sp. 8S. Este isolado é oriundo de processos de compostagem e pertence à bacterioteca do laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS. O microrganismo foi identificado, juntamente com outros isolados, através de provas morfológicas, bioquímicas e moleculares (Oliveira, 2003).

Os fungos fitopatogênicos utilizados neste trabalho foram *B. sorokiniana*, *F. graminearum* e *D. tritici-repentis*, oriundos de diferentes origens (Tab. 1) e todos compõem parte da micoteca do laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS. O presente estudo utilizou cinco isolados de *B. sorokiniana*, cinco isolados de *F. graminearum* e quatro isolados de *D. tritici-repentis*.



Tabela 1. Origem dos isolados de *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum* e *Drechslera tritici-repentis* utilizados no estudo.

Isolado	Origem
<i>B. sorokiniana</i> 98034P(1)	Vitória, Paraná
<i>B. sorokiniana</i> BS18M2P	Poza Rica, México
<i>B. sorokiniana</i> Buri Cevada	Buri, São Paulo
<i>B. sorokiniana</i> 903	Uberada, Minas Gerais
<i>B. sorokiniana</i> BS15M2P	Delicias, México
<i>F. graminearum</i> Arapuá	Arapuá/Coamo, RS
<i>F. graminearum</i> São Luiz Gonzaga	São Luiz Gonzaga, RS
<i>F. graminearum</i> 09M134	Estoque do laboratório 323 - UFRGS
<i>F. graminearum</i> Passo Fundo	Passo Fundo, RS
<i>F. graminearum</i> Arroz	Pelotas, RS
<i>D. tritici-repentis</i> 27	Vacaria, RS
<i>D. tritici-repentis</i> 45	Três de Maio, RS
<i>D. tritici-repentis</i> 5-C1/08	Ponta Porã, MS
<i>D. tritici-repentis</i> 11-C1/08	Maringá, Paraná

### Preparação da Suspensão de Esporos

Os isolados de *B. sorokiniana* e *F. graminearum* foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar cenoura (200g de cenoura cozida e triturada, 200 mL de água destilada, 4g de ágar), que é um meio de cultura para a esporulação destes fungos. Posteriormente, os inóculos foram incubados por 10 dias a 28° C. Após o período de

esporulação, utilizou-se solução salina estéril com 3 gotas/litro de Tween 80R para fazer a raspagem das placas. Com a ajuda de uma alça de Drigalski retirou-se os esporos da cultura. A suspensão obtida foi transferida para tubos cônicos estéreis e, quando necessário, foram realizadas diluições para a obtenção de uma suspensão com aproximadamente  $3 \times 10^5$  esporos/mL. A concentração foi ajustada através da contagem de conídios na câmara de Neubauer.

A esporulação de *D. tritici-repentis* ocorre em meio de cultura V8-BDA (10g ágar, 10g BDA, 3g  $\text{CaCO}_3$ , 150 mL suco V8, completar com água destilada para 1 litro). Após o inóculo em meio V8-BDA as placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D. no escuro durante cinco dias a uma temperatura de 25° C. Após cinco dias, as placas foram retiradas do escuro e realizou-se o estresse de micélio, onde as colônias foram cobertas com água destilada estéril. Em seguida, utilizou-se a base de um tubo de ensaio esterilizado para “amassar” o micélio. Posteriormente, a água foi removida e as placas foram incubadas novamente a 25° C, porém, em luz constante durante 24 horas, com o objetivo de estimular a produção dos conidióforos. Decorridas 24 horas nessas condições, a temperatura foi reduzida para 16° C e retornou-se para a condição de escuro por mais 24 horas. Neste período os conídios foram produzidos. Após o período de esporulação, com o auxílio de um pincel chato de cabo nº 20, utilizou-se solução salina estéril com 3 gotas/litro de Tween 80R para fazer a raspagem das placas. Com a ajuda de uma peneira, a solução obtida foi escoada para dentro de um béquer. Para a contagem dos esporos utilizou-se o método da gota com volume conhecido, onde foram pipetadas 3 gotas de 5  $\mu\text{L}$  cada em uma lâmina de vidro. Em seguida, realizou-se a contagem dos esporos por gota em microscópio (aumento de 100x). Após a contagem dos esporos das 3 gotas, foi realizada a média, que posteriormente foi multiplicada por 200, para obter o resultado em esporos/mL, uma vez que, 200 gotas de 5  $\mu\text{L}$  cada

completa 1 mL da solução. Sendo assim, quando necessário, a suspensão foi diluída até atingir uma concentração de  $3 \times 10^5$  esporos/mL.

### **Avaliação da Atividade Antifúngica**

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada utilizando o método de dupla-camada. O isolado de *Streptomyces* sp. 8S foi inoculado por picada em placas contendo o meio de cultura ágar amido caseína – ACA (10,0g amido, 0,3g caseína, 2,0g NaCl, 2,0g KNO<sub>3</sub>, 2,0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05g MgSO<sub>4</sub>, 0,01g FeSO<sub>4</sub>, 0,02g CaCO<sub>3</sub>) e posteriormente incubado por cinco dias a 28°C. Foram realizadas três picadas por placa, sendo que cada isolado de fungo possuía 2 placas, portanto, no total foram 6 repetições.

Para a realização do método de dupla-camada, 1 mL da suspensão com os esporos de *B. sorokiniana*, *F. graminearum* e *D. tritici-repentis*, foi homogeneizado com 9 mL de meio BDA liquefeito e a mistura obtida foi vertida sobre as placas contendo o isolado de *Streptomyces* sp. 8S crescido. Então, as placas foram incubadas durante quatro dias a uma temperatura de 28° C. Ao final do período de incubação, observou-se a presença ou ausência de halos de inibição. O diâmetro dos halos e das colônias de *Streptomyces* sp. 8S foi medido com o auxílio de um paquímetro. Para cada isolado foi feito o cálculo do Índice de Antibiose (IA) utilizando a fórmula (Rosato *et al.* 1981):

$$IA = \frac{\text{Média do Diâmetro do Halo}}{\text{Média do Diâmetro da Colônia}}$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero *Streptomyces* é amplamente conhecido por produzir metabólitos secundários que atuam como antimicrobianos. Diferentes estudos descrevem espécies de *Streptomyces* com atividade antifúngica (Shi *et al.* 2010; Spadari, 2010; Oliveira *et al.* 2010; Antunes *et al.* 2014). Sendo assim, o *Streptomyces* sp. 8S representa um microrganismo em potencial para ser utilizado no controle microbiológico dos fitopatógenos testados no presente estudo, uma vez que, o mesmo se mostrou eficiente no ensaio de dupla-camada, produzindo halos de inibição. A formação dos halos de inibição depende do nível de difusão do composto no meio de cultura sólido.

A atividade antifúngica do isolado de *Streptomyces* sp. 8S foi testada em seis repetições através do método de dupla-camada. A partir do Índice de Antibiose (IA) calculado, foi possível observar que o isolado de *Streptomyces* sp. 8S foi eficiente contra os isolados dos fungos fitopatogênicos *B. sorokiniana*, *F. graminearum* e *D. tritici-repentis* testados.

Os resultados do índice de antibiose para *B. sorokiniana* foram bem semelhantes entre si, sendo que, este foi o isolado que obteve os valores mais altos de IA, quando comparado com os outros isolados. O maior valor de IA (3,10) foi observado para o isolado 98034P(1) de *B. sorokiniana*, demonstrando a atividade antifúngica mais eficiente de *Streptomyces* sp. 8S neste estudo. Para *F. graminearum*, o valor mais alto de IA (2,94), foi observado para o isolado Arapuá. Já *D. tritici-repentis* apresentou os valores mais baixos, quando comparado com os outros isolados. Os isolados 11-C1/08 e 5-C1/08, respectivamente IA (1,68) e (1,57), apresentaram os menores valores para o índice de antibiose do presente estudo (Figura 1).

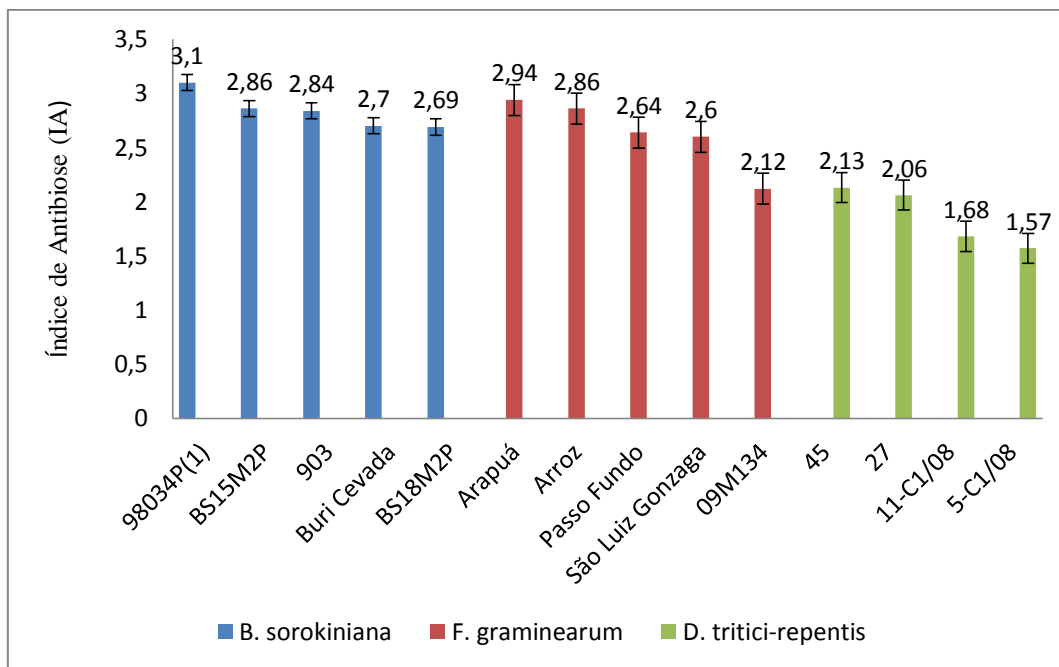


Figura 1. Valores dos Índices de Antibiose (IA) obtidos no ensaio de dupla-camada do isolado *Streptomyces* sp. 8S frente os diferentes isolados de fungos fitopatogênicos.

*D. tritici-repentis* foram os isolados fúngicos menos suscetíveis a ação do composto produzido pelo *Streptomyces* sp. 8S o que resultou nos menores valores do índice de antibiose sugerindo diferentes formas de atuação do composto antifúngico produzido pelo isolado *Streptomyces* sp. 8S.

Embora alguns estudos demonstrem que a produção de antibióticos ocorre melhor em meios sólidos quando comparado com culturas líquidas, podendo a atividade diminuir ou até mesmo deixar de ser exibida (Oliveira *et al.* 2010), considera-se interessante realizar novos ensaios para avaliar a atividade antifúngica de culturas líquidas, como por exemplo, o teste com método de difusão em poço, utilizado em estudos anteriores (Spadari, 2010; Borba, 2013). O ensaio de cultura líquida é mais interessante para a produção comercial dos compostos. Segundo Oliveira *et al.* (2010), comercialmente são encontrados produtos como, Actinovate, ActinoIron e Mycostop, que são constituídos por esporos de *Streptomyces* sp.,

atuando como biocontroladores contra os fitopatógenos *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. e *Phytophthora* sp. Desta forma, reforçando a importância do gênero *Streptomyces* no controle biológico.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados dos Índices de Antibiose (IA) obtidos foi possível concluir que o isolado *Streptomyces* sp. 8S possui atividade antifúngica contra os fitopatógenos testados *B. sorokiniana*, *F. graminearum* e *D. tritici-repentis*. Contudo, o objetivo geral do presente estudo, além de demonstrar que o isolado *Streptomyces* sp. 8S possui atividade antifúngica frente os diferentes isolados de fungos fitopatogênicos, foi acrescentar que o mesmo é capaz de produzir compostos antimicrobianos e antifúngicos contra diferentes microrganismos como demonstrado em estudos anteriores (Antunes, 2010 e 2014; Spadari, 2010; Borba, 2013). Para isso, segue a importância de se realizar novos estudos com outros microrganismos ainda não testados como, bactérias Gram negativas, além de fungos de importância clínica, como os dermatófitos. A pesquisa de novas substâncias que possuam atividade antimicrobiana e antifúngica representa uma área muito importante e que vem crescendo cada vez mais. O surgimento de patógenos considerados multi-resistentes tanto na área clínica quanto na agricultura aumenta a busca por novos métodos que sejam eficientes para realizar o controle biológico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, T. C. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. Trabalho de conclusão em Ciências Biológicas, UFRGS. 2010.

ANTUNES, T. C.; BORBA, M. P.; SPADARI, C. C.; ANTUNES, A. L.; FRAZZON, A. P. G.; GERMANI, J. C.; VAN DER SAND, S. T. Screening of actinomycetes with activity against clinical isolates of gram positive cocci with multiresistant profile. Journal of Advanced Scientific Research, 5(1): 13-17. 2014.

BORBA, M. P. Avaliação das condições ideais de crescimento para *Streptomyces* sp. – visando o potencial antimicrobiano. Trabalho de conclusão em Ciências Biológicas, UFRGS. 2013.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Letters Applied Microbiology, v. 39, n. 5, p. 425-430, 2004.

CASA, R.T. et al. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. Fitopatologia Brasileira, v.29, p.289-293, 2004.

DEL PONTE, E. M. et al. Deoxynivalenol and nivalenol in comercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in Southern Brazil. Food Chemistry, v. 132, p.1087-1091, 2012.

FELTRIN, T.; MINOTTO, E. ; MANN, M. ; SPADARI, C. , MILAGRE, L. ; VAN DER SAND, S.T. AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE DIFERENTES ISOLADOS DE *Bipolaris sorokiniana* EM PLÂNTULAS DE TRIGO. Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada ( 5. : 2011 set. 28-24 : Porto Alegre, RS). Anais. Porto Alegre : UFRGS. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. PPGMAA, 2011.

GOODFELLOW, M. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. Nov. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. [s.l.] Springer, P. 33-2028. 2012.

MINOTTO, E. Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS. 2014.

LUZ, W.C. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. Fitopatologia Brasileira. v. 26, p. 597-600, 2001.



OLIVEIRA, M.F. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processos de compostagem. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS. 2003.

OLIVEIRA, M. F. de., SILVA, M. S. & VAN DER SAND, S. T. 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 agente. Research in Microbiology 161: 565-572. 2010.

REIS, E. M.; CARMONA, M. Avaliação do Potencial de Rendimento de Lavouras de Trigo com vistas ao Controle Econômico de doenças Foliaves com Fungicidas, 3 ed. Passo Fundo, 28p. 2001.

ROSATO, Y. B.; MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L. Production of extracelular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. Journal Invertebrate Pathology. V. 38, p. 1-3. 1981.

SHI, P., YAO, G., YAHG, P., LI, N., LUO, H., BAI, Y., WANG, Y. & YAO, B. Cloning, characterization, and antifungal activity of na endo-1,3- $\beta$ -D-glucanase from *Streptomyces* sp. S27. Microbiol Biotechmol 85: 1483-1490. 2010.

SPADARI, C. C.; VAN DER SAND, S. T. Atividade antifúngica de actinomicetos frente a isolados de *Bipolaris sorokiniana*. Trabalho de Conclusão do curso em Ciências Biológicas, UFRGS. 2010.

TONIN, R. B.. Ocorrência de Fungos em Manchas Foliares de Trigo e Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* e *D. siccans* a Fungicidas In Vitro. 2012. 195 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 2012.

WATVE, M. G., TICKOO, R., JOG, M. M., BHOLE, B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Archives of Microbiology* 176:386-390. 2001.