UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CAROLINA POLANO VIVAN

"PRODUÇÃO DE BIOATIVOS ANTIMICROBIANOS DE *Burkholderia* sp. CEPA RV1R2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E AGRONÔMICA"

Londrina
2016

ANA CAROLINA POLANO VIVAN

"PRODUÇÃO DE BIOATIVOS ANTIMICROBIANOS DE *Burkholderia* sp. CEPA RV1R2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E AGRONÔMICA"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Dr. Galdino Andrade Filho.
Co-orientador: Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Vivan, Ana Carolina Polano.
PRODUÇÃO DE BIOATIVOS ANTIMICROBIANOS DE Burkholderia sp. CEPA RV1R2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E AGRONÔMICA / Ana Carolina Polano Vivan. - Londrina, 2016.
72 f.

Orientador: Galdino Andrade.
Coorientador: Admilton Gonçalves Oliveira.
Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Burkholderia cepacia - Tese. 2. Sclerotinia sclerotiorum - Tese. 3. Produtos naturais - Tese. I. Andrade, Galdino. II. Oliveira, Admilton Gonçalves. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

ANA CAROLINA POLANO VIVAN

"PRODUÇÃO DE BIOATIVOS ANTIMICROBIANOS DE *Burkholderia* sp. CEPA RV1R2:

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E AGRONÔMICA"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

_____
Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____
Prof. Dr. Luciano Ap. Panagio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____
Prof. Dra. Maria Isabel Balbi Peña
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____
Prof. Dr. Marcos Pileggi
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

_____
Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 5 de agosto de 2016.

Em memória de minha tia Marli.

Meu anjo da guarda,

minha protetora,

minha Maí.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me mostrar cada dia que sou capaz de muito mais do que imagino e me dar força em toda a caminhada;

Ao Prof. Galdino, pela oportunidade e confiança, para que eu pudesse desenvolver esse trabalho. Obrigada por me acolher na família do LEM. Foi extremamente importante para meu crescimento pessoal e profissional. Sem seu apoio e orientação, nada seria possível;

Ao meu co-orientador e amigo Junior, meu agradecimento eterno por toda a paciência, amizade, sugestões, entusiasmo, conselhos, correções. Obrigada por iluminar minhas ideias quando tudo ficava escuro e por planejar cada etapa cuidadosamente comigo. Admiro muito sua trajetória e o grande profissional que se tornou, terá pra sempre minha admiração;

À Dra. Sílvia Figueiredo Costa, por mais uma vez abrir as portas de seu laboratório em São Paulo, e à Camila Rizek, pela parceria e ajuda de sempre!

À Prof^{a}. Dra. Eliana Vespero, minha mentora na Microbiologia, pela amizade e carinho. Você é meu exemplo profissional;

A todas as pessoas (muitas) que passaram pelo LEM nesses quatro anos que estive lá, meu muito obrigada! Cada um, à sua maneira, fez minha trajetória mais alegre, rica em aprendizado e amizade. Como o Gal costuma falar, somos e seremos sempre uma família, onde um se apoia no outro e assim chegamos mais longe;

Meu agradecimento especial às amigas do LEM: Ane, Bárbara, Vanessa e Vivi, por torcerem por minha felicidade, me apoiarem quando caio e me aproximarem mais de Deus através de sua amizade. Eu amo vocês, e serei eternamente grata. Vocês são inesquecíveis!

À Janaína, pelo auxílio com os experimentos de estresse oxidativo, por toda a disponibilidade e ajuda! Boa sorte com o doutorado e conte comigo para o que precisar!

À Dione Amgarten e Joice Sifuentes, duas pessoas que me ajudaram quando mais precisei, me deram oportunidade de mostrar meu trabalho e ganharam minha eterna gratidão e admiração! Vocês são pessoas maravilhosas e profissionais admiráveis!

A todos os meus amigos e amigas de Londrina, São Manuel, Bauru, São Paulo, Budapeste, Miami, Uberlândia e resto do mundo, pela parceria, amizade, confiança e ombros amigos. Obrigada a todos por serem parte de mim e por sempre me empurrarem pra frente. Vocês são a família que escolhi;

Aos novos amigos da USC, em especial Eliane, Daniela, Érica, Andréa, Silvana, Bechara, Fabiane e Lígia. Obrigada pela acolhida, parceria e amizade;

Aos meus alunos e ex-alunos da Inesul, Dom Bosco e USC, que me fazem querer ser melhor a cada dia, e me mostram que no fim tudo vale a pena;

A todos os meus familiares, minha avó maravilhosa, meus tios e tias, meus primos e primas. Amo vocês;

Aos meus pais, os maiores incentivadores desse trabalho. Só nós sabemos o que isso significa, o tanto que nós três batalhamos para que eu estivesse aqui hoje, defendendo essa tese. Nós três, porque eu só existo se vocês estiverem comigo, porque eu sei o quanto vocês torcem pela minha felicidade, porque eu sei o quanto abdicaram de suas vidas por mim. Vocês me passam o real significado da palavra família. Sempre juntos, mesmo distantes.

“Não importa o quão estreito seja o portão

e quão repleta de castigos seja a sentença,

eu sou o dono do meu destino,

eu sou o capitão da minha alma”.

(William Ernest Henley)

VIVAN, Ana Carolina Polano. **Produção de bioativos antimicrobianos de *Burkholderia* sp. cepa RV1R2: avaliação da atividade contra patógenos de importância clínica e agronômica**. 2016. 72 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Muitos micro-organismos podem produzir os chamados metabólitos secundários, substâncias não-essenciais à sobrevivência celular, mas que podem garantir vantagens adaptativas a seus produtores. Distintos bioquimicamente dos produtos do metabolismo primário, esses compostos secundários geralmente executam funções externas à célula, já que são liberados para fora da mesma. Uma dessas funções é a atividade antimicrobiana, que, quando na natureza, auxilia estas células a exterminar possíveis competidores por nutrientes. O gênero *Burkholderia* é um dos grupos bacterianos conhecido por sua riqueza metabólica e produção de antimicrobianos naturais, com muitos compostos já descritos. A resistência a antimicrobianos na prática clínica e ambientes agrícolas já se espalhou por todo o mundo, com representantes dos reinos Monera e Fungi causando danos à saúde humana e significativas perdas econômicas. A escassez de antibióticos e pesticidas eficazes está levando à necessidade de pesquisa de novos alvos antimicrobianos, ou mesmo de drogas com múltiplos alvos de ação. Nesse cenário, os produtos naturais surgem como uma alternativa importante, já que muitos bioativos antimicrobianos já foram descritos, e os compostos de origem sintética ou semi-sintética já não tem mais ação em muitos casos. Metabólitos bacterianos podem ser uma opção para pesquisa de novos compostos de amplo espectro, que reduzam a mortalidade hospitalar ou mesmo os custos agrícolas.

Palavras-chave: Resistência bacteriana. Fitopatógenos. *Burkholderia* spp. Metabólitos secundários. Infecção hospitalar.

VIVAN, Ana Carolina Polano. **Production of antimicrobial bioactives of *Burkholderia* sp. strain RV1R2: evaluation of activity against pathogens of clinical and agronomic importance.** 2016. 72 p. Thesis (Doctoral in Microbiology) – Londrina State University, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Many micro-organisms may produce so-called secondary metabolites, non-essential ingredients to cell survival but which can ensure adaptive advantages to their producers. Biochemically distinct from primary metabolism products, these secondary compounds generally perform functions outside the cell as they are released from it. One of these functions is antimicrobial activity, which in nature helps to exterminate possible competitors for nutrients. Genus *Burkholderia* is a bacterial group known for its metabolic diversity and antimicrobial production, with many compounds previously described. Antimicrobial resistance in clinical practice and agricultural environments has spread throughout the world, with representants of Monera and Fungi kingdoms causing harm to human health and economic losses. Lack of effective antibiotics and pesticides is leading to the need for research into new antimicrobial targets, or even drugs with multiple targets. In this scenario, natural products emerge as an important alternative, as many bioactive antimicrobials have been described, and compounds of synthetic or semisynthetic origin has no more action in many cases. Bacterial metabolites may be an option to search for new broad spectrum compounds, reducing hospital mortality or agricultural costs.

Keywords: Bacterial resistance. Plant pathogens. *Burkholderia* spp. Secondary metabolites. Hospital infection.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de antibióticos produzidos por *Burkholderia* spp. 29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – *Klebsiella pneumoniae* em agar MacConkey 19
Figura 2 – *Candida albicans* em agar Saboraud 20
Figura 3 – Haste de soja infectada por *S. sclerotiorum* 23
Figura 4 – **A:** escleródios de *S. sclerotiorum*. **B:** apotécios emergindo do escleródio por germinação carpogênica. 24
Figura 5 – Ciclo de vida de *S. sclerotiorum* 25
Figura 6 – *Burkholderia* sp. em agar Kings B 28

ARTIGO A

Figura 1 – Variação do tamanho do halo de inibição (em mm) de acordo com a mudança na concentração de peptona do meio KB 47
Figura 2 – Variação do tamanho do halo de inibição (em mm) de acordo com a mudança na concentração de glicerol do meio KB.....47
Figura 3 – Inibição da cepa CbMg03 (*Candida albicans*) pela FDR na concentração de 500 µg/disco.....48

ARTIGO B

Figure 1 – Scanning eletron micrographs of *Sclerotinia sclerotiorum* hyphae treated and untreated with FDR 57
Figure 2 – Non-denaturing PAGE gel for SOD isoforms in *Sclerotinia sclerotiorum*, after incubation with FDR.....58
Figure 3 – SOD gel of *Sclerotinia sclerotiorum* incubated with FDR.....59
Figure 4 – CAT gel of *Sclerotinia sclerotiorum* incubated with FDR 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bcc	Complexo *Burkholderia cepacia*
BSA	Albumina bovina
CAT	Catalase
CCIH	Comissão de controle de infecção hospitalar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	Beta-lactamases de amplo espectro
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
KB	Kings B
KCN	Cianeto de potássio
KI	Iodeto de potássio
MDA	Malondialdeído
MHA	Agar Mueller Hinton
MIC	Concentração inibitória mínima
NBT	Tetrazólio “nitroblue”
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDA	Agar Batata Dextrose
PDC	Caldo Batata Dextrose
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SN	Sobrenadante
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TFP	Tampão fosfato de potássio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 OBJETIVOS 15
2.1 OBJETIVOS GERAIS 15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 15

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
3.1 PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA 16
3.1.1 Infecção Hospitalar ou Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) 16
3.1.2 Epidemiologia das IRAS no Brasil 17
3.1.3 Resistência a Antimicrobianos 20
3.2 PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA 22
3.2.1 *Sclerotinia sclerotiorum* 22
3.2.2 Estratégias de Controle 25
3.3 BIOATIVOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM BACTERIANA 26
3.3.1 Antibióticos Produzidos por *Burkholderia* spp 27

4 CONCLUSÕES 30

REFERÊNCIAS 31

ARTIGOS 39
ARTIGO A – Avaliação de parâmetros associados ao metabolismo secundário de *Burkholderia* sp para a produção de bioativos antimicrobianos 40
ARTIGO B – Molecular identification and antagonistic effects of a *Burkholderia* sp. strain on germination, ultrastructure and metabolism of *Sclerotinia sclerotiorum* 52

1 INTRODUÇÃO

A disseminação de mecanismos de resistência a antimicrobianos resultaram no declínio contínuo da eficácia da maioria destes ao longo das últimas décadas. A resistência bacteriana a antimicrobianos é, atualmente, um importante problema na maioria dos continentes e uma ameaça à saúde humana (GUZMAN-BLANCO; CASELLAS; SADER, 2000; PATERSON, 2006). O uso indiscriminado dessas drogas, por vários anos, nos diversos setores da saúde, tem sido um fator importante no desenvolvimento de resistência. Ainda mais grave é que cepas bacterianas multirresistentes são cada vez mais comuns em ambientes hospitalares (SAHLY et al., 2004; COLODNER, 2005). Porém, infelizmente a resistência não é restrita a bactérias, e fungos também fazem parte dessa ameaça, principalmente as leveduras do gênero *Candida*. Infecções fúngicas são uma importante causa de mortalidade hospitalar, principalmente entre pacientes imunodeprimidos ou com doenças de base. O tratamento das candidíases geralmente consiste em uso de equinocandinas ou azóis, porém, resistência a estas classes de drogas já é encontrada nas espécies *Candida albicans* e *Candida glabrata*, por exemplo (PERLIN, 2014).

Fora do ambiente hospitalar, outras áreas também enfrentam problema semelhante com micro-organismos resistentes. Resistência a pesticidas químicos em fitopatógenos já é documentada há tempos. Durante muito tempo na agricultura assumiu-se que o controle biológico de bactérias e fungos era mais efetivo do que o controle químico. Hoje, isso já não tem mais embasamento, já que vários patógenos já descritos apresentam-se resistentes a qualquer natureza de tratamento para sua extinção (BARDIN et al., 2015).

A escassez de antibióticos e pesticidas eficazes está levando à necessidade de pesquisa de novos alvos antimicrobianos, ou mesmo de drogas com múltiplos alvos de ação. Nesse cenário, os produtos naturais representam uma alternativa importante, já que muitos bioativos antimicrobianos já foram descritos, e os compostos disponíveis no mercado já não tem mais ação em muitos casos. Possíveis fontes de novos antimicrobianos são as bactérias antagonistas. Estas podem inibir o crescimento de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e protozoários (CAIN et al., 2000).

Espécies do gênero *Burkholderia* são tradicionalmente conhecidas como agentes patogênicos de plantas e seres humanos. No entanto, muitas espécies são utilizadas para aplicações biotecnológicas por sua ampla diversidade metabólica e produção de diversos bioativos já descritos (CHIARINI et al., 2006). Metabólitos bacterianos podem ser uma opção para pesquisa de novos compostos de amplo espectro, que reduzam a mortalidade hospitalar ou mesmo as perdas agrícolas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronização da produção de metabólitos secundários produzidos por *Burkholderia* sp. cepa RV1R2 e avaliação da atividade contra patógenos de importância clínica e agronômica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir bioativos antimicrobianos a partir da cepa RV1R2;
2. Otimizar o processo de produção dos metabólitos de RV1R2, avaliando sua atividade contra cepas isoladas de ambiente hospitalar;
3. Realizar a identificação fenotípica e genotípica da cepa RV1R2 a nível de espécie;
4. Testar a atividade antifúngica dos produtos de RV1R2 contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e observar alterações morfológicas correspondentes;
5. Avaliar o potencial dos metabólitos bioativos de RV1R2 de acarretar estresse oxidativo em *S. sclerotiorum,* por meio de determinação de perfil enzimático.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste trabalho, a atividade antimicrobiana dos bioativos obtidos no metabolismo secundário da cepa RV1R2 foi monitorada e testada contra dois tipos distintos de patógenos: bactérias e leveduras comumente encontradas em ambiente hospitalar, responsáveis por altas taxas de mortalidade; e um importante fungo filamentoso fitopatógeno que causa imenso prejuízo para a agricultura.

3.1 PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Existem diversos tipos de interação micro-organismo-hospedeiro, e algumas podem ser prejudiciais a este último, levando a doenças. Para isto, o patógeno invade o(s) tecido(s) do hospedeiro, multiplicando-se e causando danos. Estes podem variar de intensidade, dependendo da patogenicidade e/ou virulência do agente que está a causar o processo infeccioso (MADIGAN; MARTINKO, DUNLAP et al., 2010). Inúmeros patógenos podem vir a infectar seres humanos, e essa variedade contempla vírus, bactérias, fungos e protozoários, cada grupo causando um tipo diferente de resposta imune no hospedeiro. Tais patógenos podem ser adquiridos na comunidade onde o indivíduo está alocado, ou de passagem, assim a infecção resultante desse contato é denominada comunitária, conforme portaria 2616 de 1998 do Ministério da Saúde. Esta portaria também define como infecção hospitalar ou nosocomial o processo infeccioso que se iniciou após internação ou procedimento médico (BRASIL, 1998).

3.1.1 Infecção Hospitalar ou Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS)

De acordo com a portaria 2616 de 1998 do Ministério da Saúde, a infecção hospitalar caracteriza-se por ser adquirida após a internação do paciente, que se manifesta durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a internação e/ou procedimentos hospitalares (BRASIL, 1998). No final da

década de 90, o termo “infecção hospitalar” foi sendo gradualmente substituído por “infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS)”, por este último incluir outras unidades de apoio que não o hospital em si, como asilos e clínicas de permanência (HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008). As IRAS são responsáveis por grande parcela da taxa de mortalidade em hospitais, além de acarretarem maiores tempos de internação, uso de antimicrobianos e custo. Apesar das IRAS não serem novidade no Brasil, o controle da disseminação destas não acompanhou o ritmo de disseminação dos patógenos. As CCIH (Comissões de Controle de Infecção Hospitalar) e órgãos análogos se consolidaram após o enfrentamento de surtos de micro-organismos multirresistentes, elaborando manuais e estratégias de controle (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 100 mil mortes podem ser atribuídas a infecções hospitalares no Brasil por ano. Estas atingem cerca de 14% dos pacientes internados (OMS, 2011).

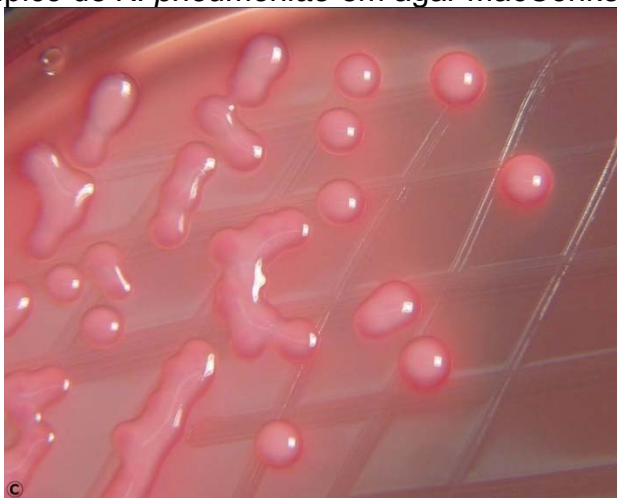
3.1.2 Epidemiologia das IRAS no Brasil

Os patógenos responsáveis pelas infecções hospitalares podem ser provenientes da própria microbiota do paciente ou adquiridos de outro hospedeiro e/ou fômite. Alguns procedimentos invasivos aumentam o risco de infecção, porém esta depende do estado imune do hospedeiro, idade, uso prévio de antimicrobianos, doença de base, entre outros fatores (GARCIA et al., 2013). De acordo com a OMS, o sítio de infecção mais comumente associado com infecção hospitalar é o trato urinário, correspondendo a quase 80% do total destas. Feridas em sítio cirúrgico e pneumonia associada à ventilação mecânica também correspondem a uma parcela importante das IRAS. Uma porcentagem pequena das infecções evoluem para bacteremia ou fungemia, mas quando evoluem, apresentam uma taxa de mortalidade associada de quase 50%, principalmente causadas por *Staphylococcus* coagulase negativa multirresistentes ou *Candida* spp. (OMS, 2002). As IRAS, portanto, têm um perfil de prevalência variado, podendo ser atribuídas a bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e fungos (principalmente leveduras), variando conforme as unidades do mesmo hospital e/ou sítio infeccioso.

Os problemas relacionados a bactérias patogênicas parecem ocorrer em ciclos: enquanto uma década pode enfrentar problemas com agentes Gram-positivos, a próxima deve enfrentar novas ameaças de bactérias Gram-negativas (LEVY, 2005). Dentre as bactérias associadas a infecções em serviços de saúde, podemos citar algumas mais importantes: bacilos Gram-positivos anaeróbios, como *Clostridium* spp., por exemplo, causando gangrena; diversos cocos Gram-positivos associados a infecções de pele, ossos, corrente sanguínea, como por exemplo *Staphylococcus aureus*; bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, conhecidos como patógenos oportunistas; e também as enterobactérias, conhecidas por causar infecções em diversos sítios e por sua grande variedade de espécies, bastante associadas a mecanismos de resistência (OMS, 2002).

A família *Enterobacteriaceae,* uma das mais importantes famílias bacterianas, compreende a espécie amplamente conhecida *Escherichia coli* estirpe K12 e muitos patógenos humanos e de animais. Com relação ao homem, esses patógenos são importantes agentes de infecção hospitalar e, sem dúvida, constituem a principal causa de infecções intestinais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Datta et al. (2014) descrevem uma avaliação dos agentes causadores de sepse neonatal num período de 5 anos, apresentando nos resultados grande representatividade de *E. coli, Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. Um trabalho que avaliou o perfil de sensibilidade de patógenos associados a infecções do trato urinário na África mostrou prevalência de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. entre os isolados (TANSARLI; ATHANASIOU; FALAGAS, 2013). Num estudo realizado por Kramer et al. (2006), avaliou-se o tempo que um patógeno hospitalar persiste em superfícies inanimadas e verificaram que *Klebsiella* spp. foi capaz de sobreviver em ambiente hospitalar por mais de 30 meses. Esses trabalhos reforçam a importância das enterobactérias no cenário mundial da infecção hospitalar, e sua grande capacidade de permanecer nestes ambientes, colonizando pacientes e até mesmo ocasionando surtos.

Figura 1 – crescimento típico de *K. pneumoniae* em agar MacConkey (24 h a 37°C).



Fonte: http://bacteriainphotos.com

Quando analisamos a importância dos fungos nas IRAS, vemos que muitos deles causam infecções durante o tratamento antibiótico prolongado e imunossupressão grave, como *Candida albicans*, *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus neoformans*. Em pacientes imunocomprometidos, estes são os principais agentes causadores de infecção de corrente sanguínea, sendo assim conhecidos como patógenos oportunistas (OMS, 2002).

As leveduras do gênero *Candida* chamam a atenção por sua capacidade de formação de biofilme em dispositivos cirúrgicos, dificultando assim, a ação dos azóis e equinocandinas, antifúngicos comumente usados na prática clínica (TAFF et al., 2013). A mortalidade associada a infecções por estes fungos pode chegar a 60 % em imunodeprimidos e pacientes em quimioterapia, por exemplo (SELEEM et al., 2016). Nas últimas décadas, o número crescente de pacientes imunodeprimidos aumentou a importância das infecções por *Candida* spp. Até 90% dos pacientes com HIV/AIDS, em algum momento do curso da doença apresentam candidíase orofaríngea, especialmente quando a carga viral está alta e a contagem de células T CD4+ está baixa (MULU et al., 2013). Atualmente, 15 espécies deste gênero já foram diferenciadas, sendo as mais importantes: *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei, C. dubliniensis, C. guilliermondii* e *C. lusitanae* (YAPAR, 2014).

Figura 2 – Cultivo de *C. albicans* em agar Saboraud (72 h a 37°C).

Fonte: http://microbiologyinpictures.com

3.1.3 Resistência a Antimicrobianos

O reconhecimento de que micro-organismos são capazes de resistir a agentes físicos e químicos data do início da era antimicrobiana. Constatou-se, então, que isto podia ser uma característica natural das espécies bacterianas, ou ser adquirida por organismos individuais em uma população sensível. Esse fenômeno é visto de forma mais dramática no ambiente hospitalar, com o surgimento dos micro-organismos multirresistentes, mas também tem sido notado em bactérias na comunidade, pela pressão seletiva determinada pelo uso clínico de antimicrobianos, tanto humano como veterinário, pelo seu uso comercial para engorda de animais e no seu uso industrial como conservantes de alimentos. Outras práticas incorretas têm contribuído para este explosivo aumento de resistência, tais como mistura de antibióticos com outras drogas, ausência de programas de controle de infecção em muitos hospitais, automedicação, uso de antibióticos sem esclarecimento do agente etiológico e seu perfil de sensibilidade, e ausência de regulamentação para ensaios clínicos com novas formulações (RIBEIRO FILHO, 2000). Esse assunto permanece uma preocupação de saúde pública crescente, com o temor de que, rapidamente, acabarão os antibióticos eficazes. Na realidade, esse panorama é mais heterogêneo, com uma melhora no que diz respeito a alguns patógenos, mas uma piora em relação a outros. No caso das enterobactérias, a disseminação de beta lactamases de amplo espectro (ESBL), AmpC e resistência a quinolonas forçou o aumento da confiança nos antibióticos carbapenêmicos, acumulando, assim,

resistência via disseminação de carbapenemases, entre outros mecanismos (LIVERMORE, 2009). Os fungos também garantem sua sobrevivência desenvolvendo resistência a drogas. Podem modificar o alvo do antifúngico, produzir enzimas, desenvolver rotas metabólicas alternativas, formar biofilme, entre outros mecanismos (GOLABEK et al., 2015).

Uma variedade de medidas de controle incluindo precauções de contato, ênfase na limpeza do meio ambiente, uso criterioso de antimicrobianos têm sido propostas para minimizar o surgimento e a dispersão de cepas multirresistentes (RAMADHAN; HEGEDUS, 2005; SHADEL et al., 2006; SIEGEL et al., 2007). O Management Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings, publicado pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention) em 2007, é um documento que enfatiza a necessidade da compreensão de intervenções relativas a medidas de controle, além de envolvimento administrativo, com o objetivo de prevenir a emergência e transmissão de micro-organismos multirresistentes. Entre estas intervenções pode-se destacar a educação da equipe médica e de outros profissionais da área da saúde, métodos de vigilância para micro-organismos resistentes, aplicação de precauções padrão no cuidado aos pacientes, medidas de cuidados como limpeza e desinfecção do ambiente do paciente colonizado ou infectado, materiais não críticos de uso exclusivo, aparelhos individuais, entre outros sistemas de comunicação, e um processo que assegure a adesão às recomendações do controle de infecção e o uso racional de antimicrobianos (SIEGEL et al., 2007).

3.2 PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA

Uma grande variedade de agentes patogênicos pode causar doença em culturas agrícolas destinadas principalmente à alimentação de humanos e animais. Os efeitos consequentes dessas infecções podem levar até mesmo ao déficit produtivo, comprometendo o abastecimento alimentar de um país. Estes patógenos, que incluem vírus, bactérias e fungos, são de difícil erradicação e controle, pois suas populações costumam apresentar variantes genotípicas e sazonais (STRANGE; SCOTT, 2005). Os pequenos agricultores costumam enfrentar maiores problemas,

pela falta de tecnologia para combater as pragas (MUTKA; BART, 2015). Outra perda relativa a essas doenças é a da biodiversidade, já que o extermínio de áreas de plantio por pragas pode até mesmo levar à extinção de algumas espécies.

Um estudo de 2006 mostra que, entre as principais espécies cultivadas, a perda potencial global total devido a pragas ficou em cerca de 50 % em relação ao trigo, e mais de 80 % na produção de algodão. Também foram estimadas perdas de 26-29 % para a soja, trigo e algodão, e 31, 37 e 40% para o milho, arroz e batatas, respectivamente (OERKE, 2006). As perdas econômicas equivalem a quantias vultuosas, e a necessidade de controle dessas doenças é urgente.

Dezenas de representantes fitopatogênicos bacterianos são descritos, sendo que representantes de muitos desses gêneros já foram descritos no Brasil. Isso pode levar até mesmo a uma limitação à exploração comercial de diversas culturas de importância econômica (ALMEIDA, 2001). Como exemplos de fitobacterioses de grande importância agrícola no Brasil podem ser citadas: a murcha do feijoeiro, causada pelo *Curtobacterium flaccumfaciens*, o “Greening”, causado pelo *Candidatus Liberibacter asiaticus,* e o cancro cítrico asiático, acarretado pela *Xanthomonas citri* pv. *citri* (MARINGONI; ROSA, 1997; FERNANDES, 2005; AMARAL, 1957; BITANCOURT, 1957).

Em relação aos fungos, estes têm sido reconhecidos por serem uma ameaça mundial à produção de alimentos. Epidemias fúngicas são relatadas na história, levando países à ruína econômica e à fome da população (FISHER et al., 2012). Em relação ao cultivo da soja no Brasil, temos diversos exemplos de doenças causadas por fungos que diminuem a produção deste grão, como: a antracnose (*Colletotrichum truncatum*), crestamento foliar (*Cercospora kikuchii*), ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), e o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), este último de difícil erradicação (ITO, 2013).

3.2.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um fungo fitopatogênico necrotrófico com uma ampla variedade de culturas atingidas, tais como soja, alface, tomate, girassol, ervilhas e outros (GARG et al., 2010). A gama de hospedeiros deste

ascomiceto pode chegar a mais de 400 espécies, sem especificidade por nenhuma, causando perdas econômicas e grande dano às áreas de cultura (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). *S. sclerotiorum* tem uma longa história taxonômica, sendo conhecido desde 1837, porém tendo passado por diversas modificações de gênero, até a nomenclatura definitiva em 1979 (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). As doenças causadas por este fungo têm diversas denominações, como mofo branco, podridão da haste e podridão da esclerotínea, formando uma massa algodonosa na superfície das hastes e folhas, e causando lesões (PURDY, 1979; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Em culturas como o feijão, o mofo branco pode levar a perdas de até 100% da produção (PEREIRA et al., 2013).

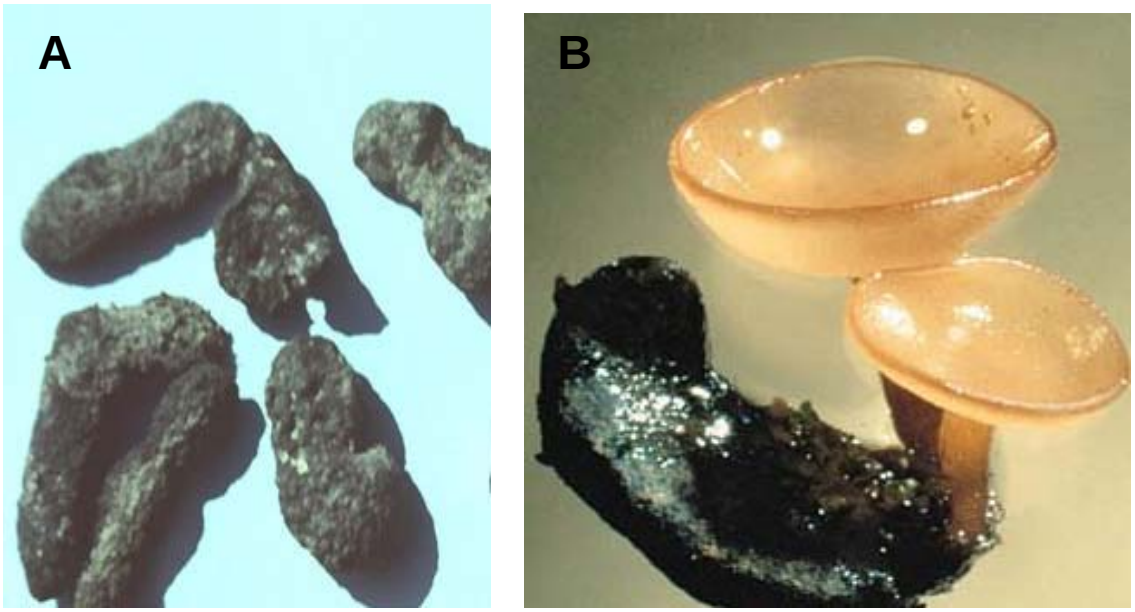
Figura 3 – Evolução da infecção por *S. sclerotiorum* em haste de soja.

Fonte: Reis et al., 2011

A infecção de uma cultura por *S. sclerotiorum* é um delicado problema agrícola, em vista da longa permanência desse fungo no ambiente infectado. Um dos fatores que colaboram para sua persistência em solos é a produção de escleródios, que são estruturas de resistência com capacidade de germinar depois de anos (WILLETTS; WONG, 1980; ADAMS; AYERS, 1979). Escleródios são aglomerados de hifas, que se comprimem e após maturação se tornam melanizados, com três camadas: o envoltório, o córtex e a medula (ORDOÑEZ-VALENCIA et al., 2015). Estes correspondem ao principal propágulo infeccioso de *S. sclerotiorum* (ROLLINS; DICKMAN, 1998). Os escleródios podem sofrer dois tipos distintos de germinação quando as condições são favoráveis: germinação miceliogênica, gerando as hifas observadas em plantas doentes; ou germinação

carpogênica, gerando apotécios, que são estruturas vegetativas responsáveis pela liberação dos ascósporos, inclusive a longas distâncias (VIEIRA et al., 2001; GORGEN et al., 2009).

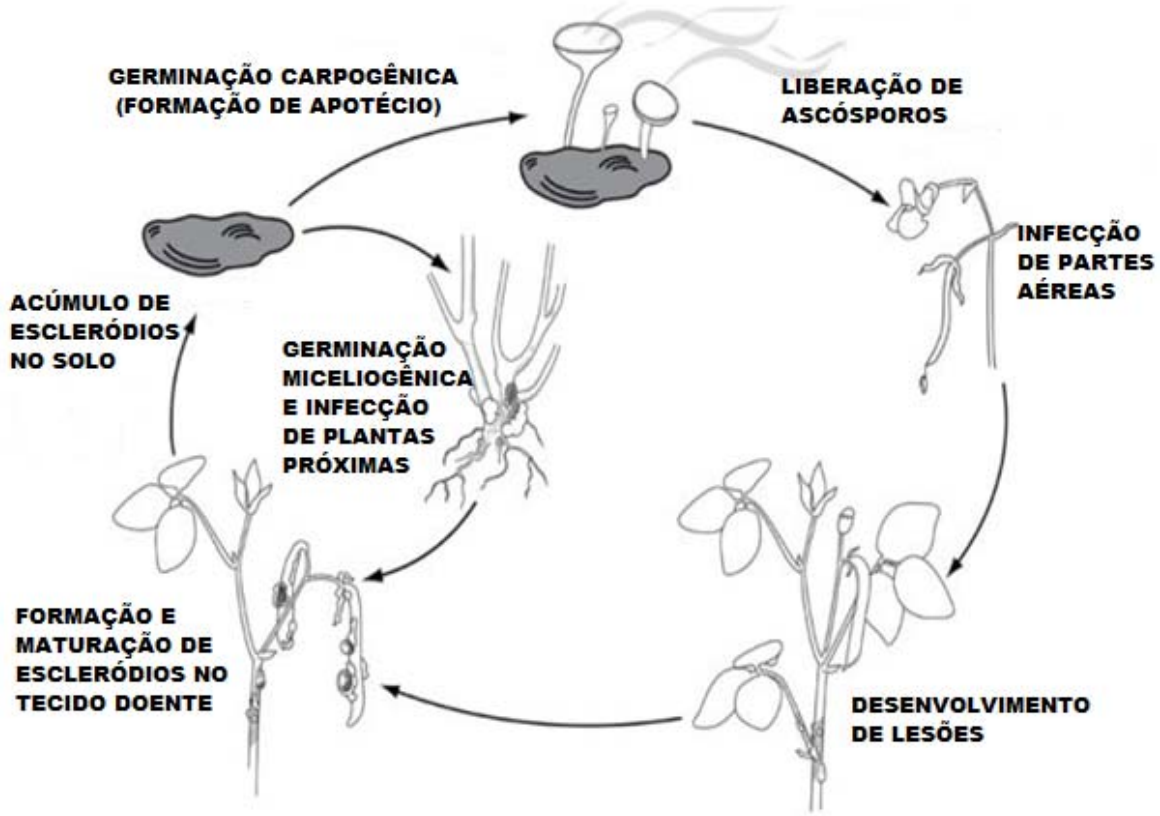
Figura 4 –A: escleródios de *S. sclerotiorum*. **B:** apotécios emergindo do escleródio por germinação carpogênica.



Fonte: Link & Johnson (2007)

Na infecção por *S. sclerotiorum*, a fonte primária de infecção são os ascósporos, liberados nos meses de primavera pelos apotécios do solo, que vão originar as hifas que se espalham pela plantação (SPITZER et al., 2012). Essas hifas vêm a formar os escleródios, que podem permanecer por anos no solo, e germinar, fechando assim, o ciclo de vida de *S. sclerotiorum*.

Figura 5 – Ciclo de vida de *S. sclerotiorum*.



Fonte: Adaptado de Link & Johnson (2007)

3.2.2 Estratégias de Controle

O combate ao mofo branco nas culturas pode ser realizado em três frentes distintas, através do controle biológico, genético ou químico. O ideal é reduzir o número de escleródios viáveis, já que esse é o maior obstáculo ao controle da infecção. Impedir o desenvolvimento dessas estruturas, ou inviabilizar sua formação são imprescindíveis para a redução dos danos causados pelo patógeno (SUMIDA et al., 2014). Essa estratégia consequentemente diminui a formação de apotécios, já que reduz a germinação carpogênica, e assim, existe a diminuição na ejeção de ascósporos (GORGEN et al., 2010).

O controle biológico, como por exemplo a aplicação de *Trichoderma harzianum* tem mostrado grande potencial de redução de escleródios (GORGEN, 2009). A utilização de antagonistas biológicos tem colaborado para a redução do

inóculo infectante, diminuindo assim, a severidade da doença, e até mesmo sua incidência (LOBO JUNIOR, 2013).

A escolha das sementes também é primordial, já que grande parte das infecções por *S. sclerotiorum* tem na semente seu foco infectivo. A seleção de cultivares resistentes pode auxiliar no sentido de mudança de duração de ciclo, não coincidindo com o ciclo fúngico (LOBO JUNIOR, 2013).

A alternativa de controle mais comumente utilizada é o uso de fungicidas químicos como carbendazim , fluazinam e vinclozolina, que têm demonstrado um bom potencial de supressão do mofo branco, tanto in vitro quanto in vivo, como relatado por diversos estudos (SPITZER et al., 2012; . MUELLER et al., 2002; . SUMIDA et al., 2014). Porém, estes podem ter problemas de eficácia por dificuldade de cobertura e coincidência com a liberação de ascósporos (SUMIDA et al., 2014). Em trabalho de 2012, Spitzer et al. avaliaram fungicidas antigos e novos, e verificaram que, o período de aplicação é mais importante nos mais antigos, sendo ideal que seja aplicado na segunda metade da floração. Os fungicidas mais novos, como as estrobilurinas, apresentaram maior efetividade. Por outro lado, estudos foram feitos para avaliar o impacto ambiental de pesticidas agrícolas em água, sedimentos e biota. Os resultados não foram animadores, uma vez que os fungicidas têm provado ser acumulados em sistemas ambientais (CCANCCAPA et al., 2016; . BELGERS; AALDERINK; VAN DEN BRINK, 2009).

A busca de alimentos livres de agrotóxicos aumenta a busca por estratégias de controle alternativo de doenças em produtos vegetais (ZANELLA et al., 2015). Muitas plantas já tem efeito antifúngico comprovado, através de seus metabólitos secundários, como fenóis, cumarinas, taninos e flavonóides (ZANELLA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2007; STANGARLIN et al., 1999; LIMA et al., 2010; SILVA et al., 2008). Este controle alternativo por produtos naturais, seja por metabólitos de plantas ou de micro-organismos, é um grande ganho para a agricultura mundial, gerando menor impacto ambiental e menor resistência.

3.3 BIOATIVOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM BACTERIANA

Existe uma crescente conscientização da necessidade do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para o tratamento de doenças em humanos, animais e plantas. Possíveis fontes de novos antimicrobianos são as bactérias antagonistas. Estas podem inibir o crescimento de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e protozoários (CAIN et al., 2000). Em *Pseudomonas* spp., por exemplo, metabólitos secundários têm a função de aquisição de nutrientes, virulência e defesa contra competidores e predadores em seu hábitat. Os genes que conferem a biossíntese desses metabólitos são componentes do grande repertório genético do micro-organismo, e medeiam as interações deste com outros organismos (GROSS; LOPER, 2009). O conhecido metabolismo primário envolve uma série de reações necessárias para a sobrevivência da célula. Já os chamados metabólitos secundários não são essenciais para o crescimento, embora provavelmente tenham funções importantes como aumentar as chances de sobrevivência do micro-organismo quando na natureza (MARTIN; DEMAIN, 1980). Algumas plantas utilizam essa liberação de metabólitos, muitas vezes tóxicos, para eliminar patógenos potenciais (DU FALL; SOLOMON, 2011). Com os micro-organismos acontece fenômeno semelhante: a escassez de nutrientes pode sinalizar um ambiente frágil e hostil, dessa maneira incentivando a liberação de compostos que exterminem qualquer “competição”.

3.3.1 Antibióticos produzidos por *Burkholderia* spp.

O gênero *Burkholderia* foi proposto em 1992, para classificar um grupo anteriormente classificado no gênero *Pseudomonas* (YABUUCHI et al., 1992). Nessa época, tratava-se de sete espécies, e hoje, o número de espécies descritas e validadas já chega a quase cem (EBERL; VANDAMME, 2016). Esse grupo foi inicialmente descoberto em 1950, como um fitopatógeno de cebola, por um cientista chamado Burkholder, daí a nomenclatura hoje empregada. Posteriormente, espécies causadoras de doenças em outras plantas foram sendo descritas, porém também indivíduos fixadores de nitrogênio e promotores de crescimento (VIAL; GROLEAU;DEKIMPE, 2007). Dentro do gênero *Burkholderia,* distingue-se um grupo de indivíduos com grande similaridade fenotípica e alguma distinção genética, denominado complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc). A este grupo pertencem representantes isolados de diversos habitats naturais, porém também patógenos

oportunistas humanos, que costumam colonizar e/ou infectar pacientes com fibrose cística. Inclusive cepas genotipicamente iguais já foram isoladas de sítios hospitalares e ambientais, mostrando a intercambialidade de habitats desses agentes (CHIARINI et al., 2006). A posição taxonômica das espécies do Bcc é constantemente modificada, devido à similaridade genética entre elas, porém algumas das espécies mais conhecidas deste grupo são: *B. cepacia, B. pyrrocinia, B. multivorans, B. cenocepacia, B. ambifaria, B. anthina* e *B. dolosa* (COENYE; VANDAMME, 2003; CHIARINI et al., 2006).

Figura 6 – *Burkholderia* sp. cultivada em agar Kings B (48 h a 28°C)

O gênero *Burkholderia* contempla espécies com aplicações biotecnológicas importantes pela sua vasta diversidade metabólica (CHIARINI et al., 2006). As espécies pertencentes ao Bcc são extensivamente estudadas em relação à sua atividade antimicrobiana, em particular contra fungos fitopatogênicos, como *Rhizoctonia solanni*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., entre outros (QUAN et al., 2006; CARTWRIGHT; CHILTON; BENSON, 1995). Estas espécies, bem como espécies de *Pseudomonas* spp. produzem metabólitos secundários importantes como pirrolnitrina, fenazina e outros compostos ativos (HWANG; CHILTON; BENSON, 2002; CARTWRIGHT; CHILTON; BENSON, 1995; MEYER; HOHNADEL; HALLE, 1989; ROITMAN; MAHONEY; JANISIEWICZ, 1990). Na tabela 1, podemos ver reunidos alguns dos metabólitos antimicrobianos produzidos por espécies do gênero *Burkholderia* já descritos.

Tabela 1 – Exemplos de antibióticos produzidos por *Burkholderia* spp.

ANTIBIÓTICO/ GRUPO DE ANTIBIÓTICOS	ESPÉCIE/CEPA PRODUTORA	ESPECTRO DE AÇÃO	REFERÊNCIA
	B. pyrrocinia	Fungos	Arima et al., 1964
Pirrolnitrina	B. cepacia NB-1	Fungos e bactérias	El-Banna; Winkelmann, 1998
	B. cepacia B37W	fungos	Burkhead; Schisler; Slininger, 1994
	B. pyrrocinia ATCC 39277	fungos	Bisacchi et al., 1987
Cepacidinas A e B	B. cepacia AF 2001	fungos	Lee et al., 1994
	B. cepacia BC11	fungos	Kang et al., 2004
Glidobactinas	Burkholderia K481-B101	fungos	Schellenberg; Bigler; Dudler,2007
CF 661	B. cepacia CF 66	fungos	Quan et al., 2006
Altericidinas	B. cepacia KB-1	fungos	Kirinuki; Ichiba; Katayama, 1984
Cepacinas A e B	B. cepacia SC 11783	bactérias	Parker et al., 1984
Fenazinas	B. cepacia 5.5 B	fungos	Cartwright; Chilton; Benson, 1995
Compostos voláteis	B. cepacia Rj 3	fungos	Kai et al., 2007
	B. cepacia ATCC 52796		

Fonte: Vial et al., 2007

4 CONCLUSÕES

O uso indiscriminado de antimicrobianos na prática clínica e agrícola tem levado a níveis cada vez mais alarmantes de resistência microbiana. Por isso, existe a necessidade urgente de pesquisa de novos fármacos com atividade antimicrobiana, que ajam em múltiplos alvos ou até mesmo novos alvos nas células microbianas. O complexo *B. cepacia* (Bcc) tem grande potencial biotecnológico, e estudos com esses micro-organismos podem conduzir à descoberta de uma nova molécula que possibilite o desenvolvimento de um novo fármaco. Isso traria novas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções por bactérias ou fungos, reduzindo a mortalidade e os custos e perdas agrícolas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathatology**, v. 69, p. 896-899, 1979.

ALMEIDA, I.M.G. Bactérias fitopatogênicas exóticas. **Biológico**, v. 63, p. 45-47, 2001.

AMARAL, S.F. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico**, v.23, p. 112-123, 1957.

ARIMA, K.; IMANAKA, H,; KOUSAKA, M. ; FUKUDA, A.; TAMURA, G. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by Pseudomonas. **Agric. Biol. Chem**, v. 28, v. 575-576, 1964.

BARDIN, M.; AJOUZ, S.; COMBY, M.; LOPEZ-FERBER, M.; GRAILLOT, B.; SIEGWART, M.; NICOT, P. C. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 566, 2015.

BELGERS, J.D.; AALDERINK, G.H.; VAN DEN BRINK, P.J. Effects of four fungicides on nine non-target submersed macrophytes. **Ecotoxicology Environment Safety,** v. 72, p. 579-584, 2009.

BISACCHI, G. S.; HOCKSTEIN, D.R.; KOSTER, W.H.; PARKER, W.L.; RATHNUM, M.L.; UNGER, S.E. Xylocandin: A new complex of antifungal peptides. II. Structural studies and chemical modifications. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 40, p. 1520-1529, 1987.

BITANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, p. 101-111, 1957.

BOLLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of Sclerotinia sclerotiorum. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 16, p. 93-108, 1994.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, p. 1-16, 2006.

BRASIL, **Ministério da Saúde. Portaria** 2.616 de 12 de maio de 1998. Brasília: Diário Oficial da União; 13 de maio de 1998. Seção 1, p. 133.

BURKHEAD, K. D.; SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J. Pyrrolnitrin production by biological control agent Pseudomonas cepacia B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2031-2039, 1994.

CAIN, C.C.; HENRY, A.T.; WALDO, R.H.; CASIDA JR, L.J.; FALKINHAM, J.O. Identification and characteristics of a novel Burkholderia strain with broadspectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4139–4141, 2000.

CARTWRIGHT, D.; CHILTON, C.; BENSON, D. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia* strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 211-216, 1995.

CCANCCAPA, A.; MASIÁ, A.; NAVARRO-ORTEGA, A.; PICÓ, Y.; BARCELÓ, D. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. **Environmentan Pollut**, v. 211, p. 414–424, 2016.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VISCA, P. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 277–286, 2006.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of Burkhoderia species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 719-729, 2003.

COLODNER, R.; RAZ, R.; CHAZAN, B.; SAKRAN, W. Susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria isolated from inpatients to five antimicrobial drugs in a community hospital in Northern Israel. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v.24, p.409-410, 2004.

DATTA, S.; ROY, S.; CHATTERJEE, S.; SAHA, A.; SEN, B.; PAL, T.; BASU, S. A Five-Year Experience of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae Causing Neonatal Septicaemia: Predominance of NDM-1.**PLoS ONE**, v. 9, 2014.

DU FALL, L.A.; SOLOMON, P.S. Role of Cereal Secondary Metabolites Involved in Mediating the Outcome of Plant-Pathogen Interactions. **Metabolites**, v. 1, p. 64–78, 2011.

EBERL, L.; VANDAMME, P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. **F1000Research**, v.5, p.1000 1007, 2016.

EL-BANNA, N.; WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from Burkholderia cepacia: Antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 69-78, 1998.

FERNANDES, N. G. Huanglongbing (Greening) – considerações gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30 (Suplemento), p. 40-41, 2005.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. *484*, p. 73-93, 2012.

GARCIA, L.M.; CÉSAR, I.C.O.; BRAGA, C.A.B.; SOUZA, G.A.A.D.; MOTA, E.C. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentesem um hospital do norte de Minas Gerais. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção,** v. 3, p. 45-49, 2013.

GARG, H.; LI, H.; SIVASITHAMPARAM, K.; KUO, J.; BARBETTI, M.J. The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of a resistant and a susceptible genotype of *Brassica napus*. **Annals of Botany**, v.106, p. 897-908, 2010.

GOLABEK, K.; STRZELCZYK, J.K.; OWCZAREK, A.; CUBER, P.; SLEMP-MIGIEL, A., WICZKOWSKI, A. Selected mechanisms of molecular resistance of Candida albicans to azole drugs**. Acta Biochim Pol**, v. 62, p. 247–251, 2015.

GORGEN, C. A.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L. C.; RAGAGNIN, V. A.; LOBO JUNIOR, M. Controle do mofo-branco com palhada e Trichoderma harzianum 1306 em soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.44, p.1583-1590, 2009.

GORGEN, C. A.; CIVARDI, E. A.; RAGAGNIN, V. A.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L. C.; LOBO JUNIOR, M. Redução do inóculo inicial de Sclerotinia sclerotiorum em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.45, p.1102-1108, 2010.

GROSS, H.A.; LOPER, J.B. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. **Natural Products Reports**, v. 26 p. 1408–1446, 2009.

GUZMAN-BLANCO, M.; CASELLAS, J. M.; SADER, H. S. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. **Infectious Disease Clinics of North America,** v.14, p.67-81, 2000.

HORAN TC, ANDRUS M, DUDECK MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **American Journal of Infection Control**, v. 36, p.309-332, 2008.

HWANG, J.; CHILTON, W.; BENSON, D.M. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. **Biological Control**, v. 25, p. 56–63, 2002.

ITO, M.F. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, v. 10, 2013.

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen Rhizoctonia solani. **Archives Microbiology,** v. 187, p. 351-360, 2007.

KANG, J. G.; SHIN, S.Y.; KIM, M.J.; BAJPAI, V.; MAHESHWARI, D.K.; KANG, S.C. Isolation and anti-fungal activities of 2-hydroxymethyl-chroman-4-one produced by Burkholderia sp. MSSP. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 57, p. 726-731, 2004.

KIRINUKI, T.; ICHIBA, T.; KATAYAMA, K. General survey of action site of altericidins on metabolism of Alternaria kikuchiana and Ustilago maydis**. J. Pestic. Sci, v.**9, p. 601-610, 1984.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMP, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infectious Diseases,** v.6, p.130, 2006.

LEE, C. H.; KIM, S.; HYUN, B.; SUH, J.W.; YON,C.; KIM,C.; LIM,Y.; KIM, C. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by Pseudomonas cepacia. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. **Journal of Antibiotics (Tokyo),** v. 47, p.1402-1405, 1994.

LEVY, S.B. Antibiotic resistance – the problem intensifies. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 57, p.1446– 1450, 2005.

LIMA, N.B.; MARQUES, M.W.; CAIXETA, L.; NAUE, C.R. Avaliação do extrato de aroeira (Schinus terebinthifolius Raddi) sobre o crescimento de Colletotrichum gloeosporioides in vitro. In: J**ORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10.** 2010, Recife. Anais. Recife: UFRPE, 2010.

LINK, V.H.; JOHNSON, K.B. White Mold. **The Plant Health Instructor**. 2007.

LIVERMORE D. M. Has the era of untreatable infections arrived? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 64, p.29-36, 2009.

LOBO JUNIOR, M. Perspectivas e recentes resultados do uso de microrganismos no

controle de doenças do feijoeiro comum. **Feijão: produção e sustentabilidade**, p.97-108, 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128p.

MARINGONI, A.C.; ROSA, E.F. Occurrence of Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens on bean in the State of São Paulo, Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 160-162, 1997.

MARTIN, J.F.; DEMAIN, A.L. Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiol Rev**, v. 44, p. 230–251, 1980.

MEYER, J.M.; HOHNADEL, D.; HALLE, F. Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. **J Gen Microbiol**, v. 135, p.1479 – 1487, 1989.

MUELLER, D.S.; DORRANCE, A.E.; DERKSEN, R.C.; OZKAN, E.; KURLE, J.E.; GRAU, C.R.; GASKA, J.M.; HARTMAN, G.L.; BRADLEY, C.A.; PEDERSEN, W.L. Efficacy of fungicides on Sclerotinia sclerotiorum and their potential for control of sclerotinia stem rot on soybean. **Plant disease,** v. 86, 2002.

MULU, A.; KASSU, A.; ANAGAW, B.; MOGES, B.; GELAW, A.; ALEMAYEHU, M.; ISOGAI, E. Frequent detection of *"azole"* resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. **BMC Infectious Diseases,** v.13, p. 82, 2013.

MUTKA, A. M.; BART, R. S. Image-based phenotyping of plant disease symptoms. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 734, 2014.

OERKE, E.C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, v. 144, p. 31-43, 2006.

ORDÓÑEZ-VALENCIA, C.; FERRERA-CERRATO, R.; QUINTANAR-ZÚÑIGA, R.E.; FLORES-ORTIZ, C.M.; MÁRQUEZ GUZMÁN, G.J.; ALARCÓN, A.; LARSEN, J.; GARCÍA-BARRADAS, O. Morphological development of sclerotia by Sclerotinia sclerotiorum: a view from light and scanning electron microscopy. **Ann Microbiology**, v. 65, p.765–770, 2015.

Organização Mundial da Saúde (World Health Organization (WHO)). Department of Communicale Disease, Surveillance and Response. Prevention of Hospital-acquired infections. A pratical guide. 2nd edition, 2002.

Organização Mundial da Saúde. Diminuindo diferenças: a prática das políticas sobre determinantes sociais da saúde: documento de discussão. Rio de Janeiro: OMS; 2011.

PADOVEZE, M.C.; FORTALEZA, C.M.C.B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Revista de Saúde Pública,** v. 48, p. 995-1001, 2014.

PATERSON, D.L. Resistance in Gram-negative Bacteria: Enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine,** v. 119, p. 20-28, 2006.

PEREIRA, F.S.; BORGES, L.P.; GUIMARÃES, G.R.; SILVA, A.; GONÇALVES, R.N.; CARVALHO, L.R.; TEIXEIRA, I.R. Estratégias de controle de mofo branco do feijoeiro. **Enciclopédia Biosfera,** v. 9, p. 1354-1371, 2013.

PERLIN, D. S. Echinocandin Resistance, Susceptibility Testing and Prophylaxis: Implications for Patient Management. **Drugs**, v.74, p. 1573–1585, 2014.

PARKER, W. L.; RATHNUM, M.L.; SEINER, V.; TREJO, W.H.; PRINCIPE, P.A.; SYKES, R.B. Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by Pseudomonas cepacia. **Journal of Antibiotics (Tokyo),** v. 37, p. 431-440, 1984.

PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, v. 69, p.875-880, 1979.

QUAN, C.S.; ZHENG, W.; LIU, Q.; FAN, S.D. Isolation and characterization of a novel Burkholderia cepacia with strong antifungal activity against Rhizoctonia solani. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 72, v. 1274–1284, 2006.

RAMADHAN, A.A.; HEGEDUS, E. Survivability of vancomycin resistant enterococci and fitness cost of vancomycin resistance acquisition. **Journal Clinical Pathology**, v. 58, p.744-746, 2005.

REIS, E.M.; BRUSTOLIN, R.; DANELLI, A.; TREZZICASA, R. Manejo integrado do mofo-branco. **Revista Plantio Direto**, e. 122, 2011.

RIBEIRO FILHO, N. Resistência Bacteriana aos Antibióticos. In: FERNANDES, A. T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde.** Ed. Atheneu, São Paulo, 2000, cap. 85, p. 1550-1557.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI-TUTIDA, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra Sclerotinia sclerotiorum pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.124-128, 2007.

ROITMAN, J.N.; MAHONEY, N.E.; JANISIEWICZ, W.J. Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia.* **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 381-386, 1990.

ROLLINS, J.A.; DICKMAN, M.B. Increase in endogenous and exogenous cyclic AMP levels inhibits sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2539–2544, 1998.

SAHLY, H.; AUCKEN, H.; BENEDI, V.J.; FORESTIER, C.; FUSSING, V.; HANSEN, D.S.; OFEK, I.; PODSCHUN, R.; SIROT, D.; TOMÁS, J.M.; SANDVANG, D.;

SCHELLENBERG, B., BIGLER, L.; DUDLER, R. Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1640-1650, 2007.

SELEEM, D.; CHEN, E.; BENSO, B.; PARDI, V.; MURATA, R.M. *In vitro* evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms. **Peer J**, v. 4, p. 2148, 2016.

SHADEL, B.N.; PUZNIAK, L.A.; GILLESPIE, K.N.; LAWRENCE, S.J.; KOLLEF, M.; MUNDY, L.M. Surveillance for vancomycin-resistant enterococci: type, rates, costs, and implications. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v.27, p.1068-1075, 2006.

SIEGEL, J. D.; RHINEHART, E'; JACKSON, M.; CHIARELLO, L. **2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings.** 2007. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_isolation.html>

SILVA, L.J.; SILVA, M.S.; SILVA, L.N.; RABELLO, A.R.; ALVES, R.S.; ESPÍNDOLA, L.S.; PAULA, J.E.; VIEIRA, E.A.; LIMA, T.R.; ANJOS, J.R.N. Fungos fitopatogênicos de soja são sensíveis a extratos orgânicos de planta "fruta-do-conde", nativa do cerrado do gênero Annona sp. (Família Annonaceae). **In: SIMPOSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS,** 2., 2008, Brasília. Anais... Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

SPITZER, T.; MATUŠINSKY, P.; KLEMOVÁ, Z.; KAZDA, J. Effect of Fungicide Application Date against Sclerotinia sclerotiorum on Yield and Greening of Winter Rape. **Plant Protection Science**, v. 3, p. 105–109, 2012.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.23, p.16-21, 1999.

STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: a threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p. 83–116, 2005.

SUMIDA, C.H.; CANTERI, M.G.; PEITL, D.C.; ORSINI, I.P.; TIBOLLA, F.; ARAÚJO, F.A., CHAGAS, D.F. Inibição micelial in vitro de *Sclerotinia sclerotiorum* por fungicidas. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 90-91, 2014.

TAFF, H. T.; MITCHELL, K. F.; EDWARD, J. A.; ANDES, D. R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, 2013.

TANSARLI, G. S.; ATHANASIOU, S.; FALAGAS, M. E. Evaluation of Antimicrobial Susceptibility of Enterobacteriaceae Causing Urinary Tract Infections in Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 3628–3639, 2013.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** Ed. Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, 2008.

VIAL, L.; GROLEAU, M.C.; DEKIMPE, V. Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, v. 1407–1429, 2007.

ULLMANN, U. Increased serum resistance in Klebsiella pneumoniae strains producing extended-spectrum ß-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 48, p.3477-3482, 2004.

VIEIRA, R.F.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PERES, A.P.; MACHADO, J. C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p.770-773, 2001.

WILLETTS, H. J.; WONG, J.A. The Biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with Emphasis on Specific Nomenclature. **Botanical Reviews***,* v. 46, p. 101-165, 1980.

YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., OYAIZU, H., YANO, I., HOTTA, H., HASHIMOTO, Y., EZAKI, T. AND ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and Transfer of Seven Species of the Genus*Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia cepacia*(Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology,** v. 36, p. 1251–1275, 1992.

YAPAR N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapy Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95-105, 2014.

ZANELLA, C. D. S., GAVASSONI, W. L., BACCHI, L. M. A., & FORMAGIO, A. S. N. Activity of plant extracts on the carpogenic germination and mycelial growth of Sclerotinia sclerotiorum. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-8, 2015.

ARTIGOS

ARTIGO A

Avaliação de parâmetros associados ao metabolismo secundário de *Burkholderia* sp. para a produção de bioativos antimicrobianos

*Ana Carolina Polano Vivan[1], Galdino Andrade Filho[1]

[1] Departamento de Microbiologia – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina.

*Corresponding-author: andradeg@uel.br

RESUMO

A necessidade de pesquisa de novos fármacos com atividade antimicrobiana é urgente, e um número significativo de drogas é produzido por micro-organismos e/ou interações microbianas. A obtenção da cepa bacteriana RV1R2, objeto do presente trabalho, foi resultado de uma prospecção realizada no município de Itararé-SP, às margens do Rio Verde. Esta cepa foi analisada pelo sistema automatizado Phoenix (BD), que indicou se tratar de uma bactéria do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc). Após testes preliminares, observou-se que a mesma atuava como antagonista do crescimento de alguns patógenos hospitalares. As condições de cultivo da cepa foram variadas, para obter a padronização do método de produção dos metabólitos antimicrobianos. Os testes para avaliação da atividade foram feitos através do teste de poço com adição do sobrenadante concentrado e livre de células da cultura da bactéria antagonista, contra micro-organismos de importância clínica. Dessa forma, foram testados os seguintes meios de cultura líquidos: RC, TY, LB e KB, sendo que apenas em cultivo neste último houve produção de ativos antimicrobianos contra as cepas patogênicas do estudo. Após esse teste, as concentrações de peptona e glicerol deste meio de cultura também foram modificadas e testadas, obtendo uma curva de atividade versus concentração. O meio KB com concentrações inferiores às padrões destas duas substâncias apresentou maior atividade que os demais, otimizando o processo. Também foram testadas condições de cultivo em sistema controlado com aeração, apresentando esse tipo de cultura maior atividade antimicrobiana contra os patógenos do que a produção em shaker com agitação. Os testes foram realizados contra uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* e uma cepa de *Candida albicans.* Os resultados deste estudo podem conduzir à descoberta de uma nova molécula que possibilite o desenvolvimento de um novo fármaco. Isso traria novas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções por micro-organismos multirresistentes, reduzindo a mortalidade relacionada a infecções hospitalares.

Palavras-chave: *Burkholderia cepacia* complex, KPC, *Candida albicans,* metabólitos secundários

Introdução

O advento da modernidade em técnicas médicas, procedimentos invasivos e uso maciço de antimicrobianos tem levado o problema da infecção hospitalar a um patamar global. Isso leva a um aumento da mortalidade hospitalar e dos custos envolvidos com as internações (CHEN et al., 2013). Os agentes responsáveis por essas infecções compreendem bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e fungos (principalmente as leveduras do gênero *Candida*). *Klebsiella pneumoniae,* bacilo Gram-negativo da família das enterobactérias*,* em particular, é um patógeno extremamente importante em infecções hospitalares, uma vez que pode apresentar resistência múltipla a antimicrobianos de diferentes classes (PATERSON et al., 2006). *Candida albicans*, por sua vez, é um patógeno oportunista, que tem grande importância em pacientes imunodeprimidos e pacientes com microbiota natural reprimida. A mortalidade associada a infecções por este fungo pode chegar a 60 % em imunodeprimidos e pacientes em quimioterapia, por exemplo (SELEEM et al., 2016). A terapia antimicrobiana é uma das grandes conquistas da humanidade. A redução da mortalidade associada a infecções bacterianas é uma realidade, mas está ameaçada pelo desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (HAWKEY et al., 2008). Os ambientes atuais relacionados à assistência à saúde, e também as comunidades, estão sendo tomados pelos genes de resistência a antimicrobianos. O agravante desta situação é a facilidade de transmissão destes, intra e interespécies (LEVY et al., 2005). Existe uma crescente conscientização da necessidade do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para o tratamento de doenças em humanos, animais e até mesmo plantas, já que problemas de resistência a pesticidas vêm sendo observados em lavouras pelo mundo todo. Possíveis fontes de novos antimicrobianos são as bactérias antagonistas. Estas podem inibir o crescimento de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e protozoários (CAIN et al., 2000). Os genes envolvidos na biossíntese desses metabólitos são componentes do grande repertório genético do microrganismo, e medeiam as interações deste com outros organismos (GROSS; LOPER, 2009). Espécies do gênero *Burkholderia* são tradicionalmente conhecidas como agentes patogênicos de plantas e seres humanos. No entanto, muitas espécies são utilizadas para aplicações biotecnológicas por sua ampla diversidade metabólica (NEWMAN & CRAGG 2007).

Uma estirpe pertencente a este mesmo complexo é estudada no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Com base neste grande potencial biotecnológico, deu-se a investigação da possível atividade antimicrobiana da mesma. Este trabalho visa otimizar a produção dos metabólitos ativos da cepa de *Burkholderia* sp. e padronizar o método de produção dos metabólitos antimicrobianos.

Materiais e métodos

Isolamento, identificação preliminar e cultivo bacteriano

Amostras de solo foram coletadas em Rio Verde, Itararé -SP, Brasil (S 24 ° 05'04.8 "; W 049 ° 12'06.0 ") em 2012, em um experimento de bioprospecção. As amostras foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85 %), submetidas a diluições em série e plaqueadas em diferentes meios de cultura. RV1R2 foi o isolado escolhido para este estudo, então foi realizada a coloração de Gram. O isolado foi cultivado em agar nutriente e incubado durante 48 h a 28 °C para a sua identificação preliminar pelo sistema automatizado VITEK® (BioMérieux), no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL). A cepa foi criopreservada em 30% de glicerol e 70% caldo KB (peptona, glicerol, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_20$) e semeaduras semanais foram realizadas para assegurar a viabilidade do isolado.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Testes preliminares

Os primeiros experimentos relativos à avaliação da atividade antimicrobiana foram feitos contra oito cepas, fornecidas pelo HU-UEL: KPC 321, KPC 23 e KPC 97

(*Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC); KPC 18 (*Enterobacter cloacae* produtor de KPC); Ac 358 e Ac 351 (*Acinetobacter baumannii*); N 315 (*Staphylococcus aureus*), CbMg03 (*Candida albicans*). Estes foram realizados por teste de antagonismo direto, cultivando RV1R2 no centro de uma placa de agar nutriente, e em seguida cobrindo-a com uma camada de *pour plate* do agente patogênico em teste. As placas foram incubadas a 37 °C por 18-24 h.

Produção e extração de substâncias bioativas

Os seguintes meios de cultura líquidos foram testados a 28 °C, sob agitação de 100 rpm durante 10 dias: RC (extrato de levedura e glicose), TY (triptona, extrato de levedura e $CaCl_2$), LB (triptona, extrato de levedura e NaCl), P1 (KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$, KCl, $NaNO_3$, desoxicolato de sódio, betaína) e KB (peptona, glicerol, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_20$). Depois deste teste, a concentração de peptona e glicerol do meio de cultura escolhido também foram modificadas e testadas, obtendo uma curva de atividade em função da concentração. Foram testadas quatro concentrações de peptona (5, 10, 15 e 20 g/L), e quatro concentrações de glicerol (2,5, 5,0, 7,5 e 10 mL/L). As condições de cultura foram também testadas no sistema controlado de aeração, em galões com capacidade para 10 litros (Nalgene®), com fluxo de ar filtrado constante. Estas condições foram avaliadas quanto ao potencial de inibição de uma cepa de *K. pneumoniae* (KPC 97) pelo teste de sobrenadante (VASCONCELLOS et al., 2014). As células foram removidas do caldo de cultura por centrifugação (10000 rpm/ 20 minutos), e o sobrenadante foi concentrado a 1/10 do volume inicial em rotaevaporador Buchi® R215. O sobrenadante filtrado foi dispensado em poços de 9 mm de diâmetro no centro da placa de MHA (150 mL cada), já inoculado com o patógeno teste (KPC 97). Três solventes orgânicos (hexano, diclorometano e acetato de etila) foram testados quanto à sua capacidade de extrair os metabólitos ativos a partir do sobrenadante isento de células, por partição líquido-líquido. Alíquotas de 100 mL de sobrenadante foram acrescidas de 200 mL do solvente correspondente, e o método extrativo foi repetido dez vezes. A fase orgânica de cada partição foi coletada, concentrada e liofilizada (Jouan® LP3). De acordo com o protocolo adaptado de Góis et al. (2013), discos de papel estéreis com 9 mm de diâmetro cada, foram impregnados com 500 ug de fração diluída em

solvente correspondente (hexano, diclorometano e acetato de etila) (10 µL por disco). A atividade de cada fração foi avaliada contra KPC 97 e CbMg03 (GÓIS et al., 2013). Para o inóculo bacteriano, foi utilizada escala 0,5 de Mc Farland, e para a levedura procedeu-se à contagem de células em Câmara de Neubauer (10^6 células/mL).

Resultados e discussão

Isolamento bacteriano e identificação preliminar

No plaqueamento inicial, RV1R2 cresceu em meio Martin, e depois veio a ser cultivada em agar nutriente, que mostrou o pigmento amarelo-esverdeado, a 28 °C, com bom crescimento em 48 h. Na coloração de Gram, observou-se um bacilo Gram-negativo. A identificação pelo sistema automatizado Vitek mostrou se tratar de um membro do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) (94 % de confiança). O gênero *Burkholderia*, anteriormente classificado como *Pseudomonas cepacia*, é conhecido por compreender importantes produtores de metabólitos antifúngicos, tanto contra leveduras quanto fungos filamentosos. Pirrolnitrina, fenazina e cepacidina A são alguns dos compostos antifúngicos já documentados (HWANG; CHILTON; BENSON, 2002; LEE et al., 1994; CARTWRIGHT; CHILTON; BENSON, 1995; ROITMAN; MAHONEY; JANISIEWICZ, 1990). Algumas cepas de *Burkholderia* sp. com atividade antibacteriana também já foram documentadas (VIAL et al., 2007). No presente estudo, observou-se a ação antifúngica e antibacteriana de metabólitos produzidos por esta cepa.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Em testes iniciais, as cepas testadas foram todas inibidas em algum nível pela RV1R2 (dados não mostrados). O tamanho dos halos variou de 10 mm (KPC 321) a 31 mm (CbMg03). Estes resultados demonstram que a atividade inibidora não

é restrita aos fungos. Assim, optamos por uma cepa bacteriana (KPC 97) e uma levedura (CbMg03) para continuar os ensaios de atividade antimicrobiana. De acordo com inventário publicado em 2007, a maioria das cepas de *Burkholderia* sp. exibem atividade antibacteriana ou antifúngica, sendo rara a presença dos dois na mesma estirpe (VIAL et al., 2007). Entre os meios de cultura testados para a produção de metabólitos antimicrobianos pela cepa RV1R2, apenas o cultivo em KB apresentou resultados significativos, sendo que os demais não estimularam a produção de metabólitos pela cepa. Isso pode ser devido à presença de ingredientes como peptona e glicerol, presentes apenas na formulação do KB. Quando testados contra *K. pneumoniae*, o sobrenadante da cultura forneceu halos de inibição significativos. Quando a concentração do meio de peptona foi alterada, triplicou o tamanho da zona de inibição (6 mm na concentração padrão de 20 g/L versus 18 mm a uma concentração de 10 g/L) (Figura 1). Em relação ao glicerol, a atividade foi melhor quando utilizada uma concentração 25% menor do que o padrão (29 mm x 18 mm na concentração padrão) (Figura 2). Quando o cultivo foi transferido para o sistema de aeração, os halos aumentaram consideravelmente de tamanho (cerca de 33 mm x 29 mm do sistema antigo), e sistema de produção foi otimizado em relação ao volume de meio de cultura. No sistema de aeração, podem ser cultivados 5 litros de caldo em um só galão, reduzindo inclusive os dias necessários para a produção dos metabólitos ativos, de 10 para 7 dias. Estes resultados permitiram-nos otimizar o processo de produção de bioativos, reduzindo os custos e aumentando a atividade. Estes resultados indicam que o cultivo em um meio de cultura com uma menor concentração de nutrientes foi mais estressante para as células bacterianas, aumentando a liberação de metabólitos para fora da célula. O conhecido metabolismo primário envolve uma série de reações necessárias para a sobrevivência da célula. Já os chamados metabólitos secundários não são essenciais para o crescimento, embora provavelmente tenham funções importantes como aumentar as chances de sobrevivência do micro-organismo quando na natureza (MARTIN & DEMAIN, 1980).

Algumas plantas utilizam essa liberação de metabólitos, muitas vezes tóxicos, para eliminar patógenos potenciais (DU FALL & SOLOMON, 2011). Com os micro-organismos acontece fenômeno semelhante, a escassez de nutrientes pode sinalizar um ambiente frágil e hostil, dessa maneira incentivando a liberação de compostos que exterminem qualquer “competição”. O aumento da atividade antimicrobiana com

a diminuição de nutrientes como a peptona e o glicerol pode ter relação com esse estresse metabólico resultante da escassez nutricional.

Fig. 1. Variação do tamanho do halo de inibição (em mm) de acordo com a mudança na concentração de peptona do meio KB, de 2,5 g/L até 10 g/L (concentração padrão) (Avaliação feita por meio de teste de poço contra KPC 97).

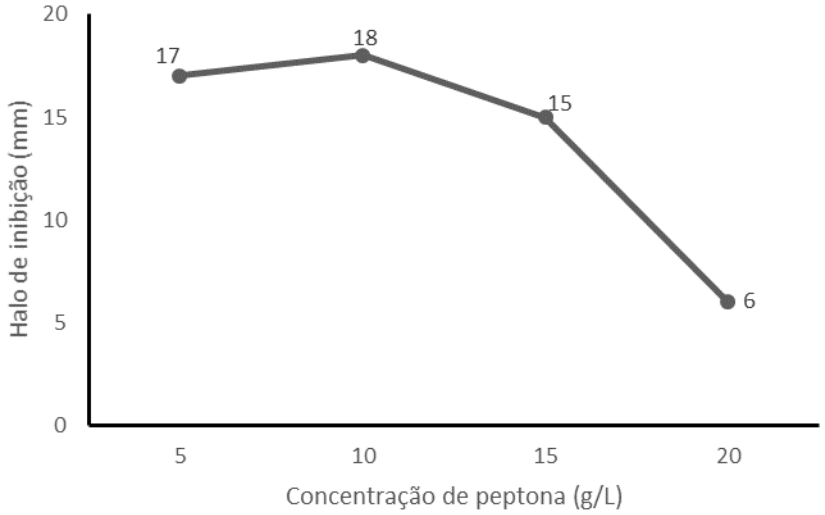
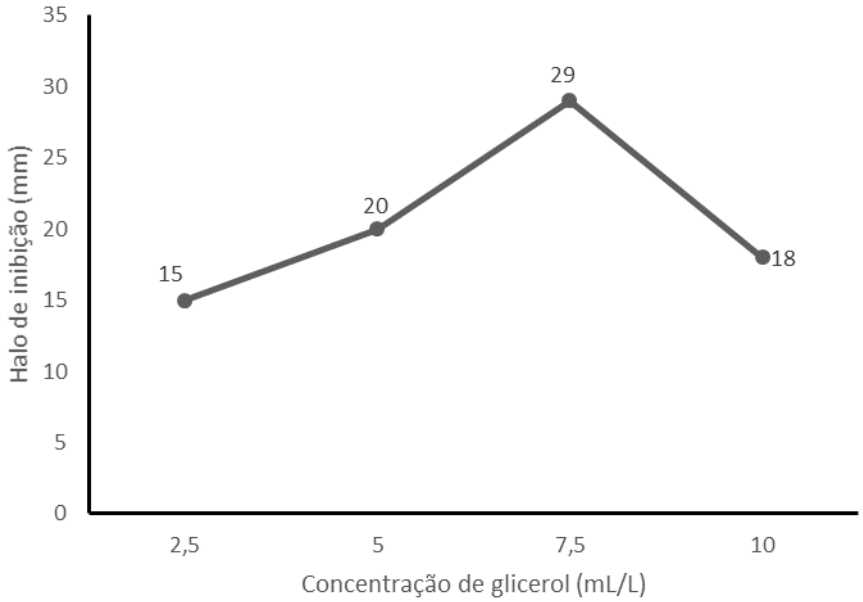
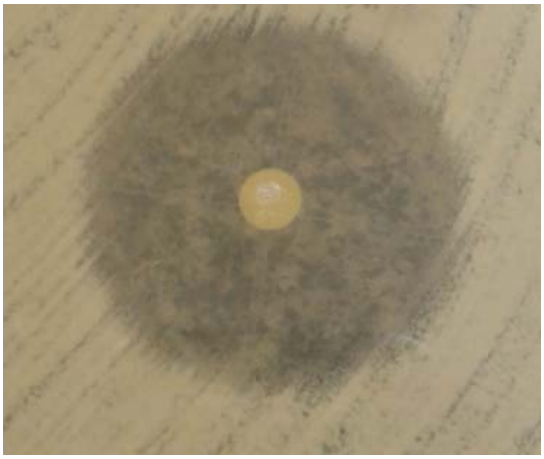


Fig. 2. Variação do tamanho do halo de inibição (em mm) de acordo com a mudança na concentração de glicerol do meio KB, de 2,5 mL/L até 10 mL/L (concentração padrão) (Avaliação feita por meio de teste de poço contra KPC 97).



Dos três solventes testados, apenas o diclorometano mostrou ter afinidade com as substâncias antimicrobianas produzidas pela cepa RV1R2, pois foi a única fração a inibir significativamente KPC 97 e CbMg 03 pela disco difusão. Dessa forma, a fração obtida e estudada neste trabalho é chamada de FDR (fração diclorometano). Em relação à KPC 97, os halos resultantes foram de, em média, 35 mm. Quando testados contra CbMg 03, FDR mostrou halos de inibição de até 40 mm na concentração de 500 ug/disco (Figura 3).

Fig. 3. Inibição da cepa CbMg03 (*Candida albicans*) pela FDR na concentração de 500 µg/disco (disco difusão em agar Sabouraud)



Conclusões

O aumento da mortalidade relacionada a infecções hospitalares é a grande preocupação das comissões de controle de infecção hospitalar (CCIH). Somado a isso, existe o problema da resistência a antimicrobianos e a escassez de antimicrobianos ainda eficazes para tais infecções. As intervenções necessárias para melhorar esse cenário compreendem ações multiprofissionais, como educação da equipe de saúde, vigilância de micro-organismos multirresistentes e uso racional de antibióticos (SIEGEL et al., 2007). Por estas razões, existe a necessidade urgente de pesquisa de novos fármacos com atividade antimicrobiana, que ajam em múltiplos alvos ou até mesmo novos alvos nas células microbianas. Em recente trabalho, foi descrita a atividade de um composto produzido por uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* contra bactérias produtoras de KPC, mostrando que os produtos naturais são um nicho a ser explorado na luta contra os patógenos de importância clínica (KERBAUY et al., 2016). Nossos resultados preliminares indicam o grande potencial antimicrobiano desta cepa do complexo *B. cepacia* (Bcc) e, possivelmente, esta atividade deve gradualmente aumentar à medida que o grau de purificação do extrato aumentar também. Estes achados podem conduzir à descoberta de uma nova molécula que possibilite o desenvolvimento de um novo fármaco. Para isso, é necessário obter e purificar as moléculas com ação antibiótica, e identificar as possíveis vias de biossíntese do processo de produção dos metabólitos ativos. Isso traria novas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções por bactérias ou fungos, reduzindo a mortalidade.

REFERÊNCIAS

Cain CC, Henry AT, Waldo RH, Casida Jr LJ, Falkinham JO. 2000. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broadspectrum antimicrobial activity. Appl Environ Microbiol. 66: 4139–4141.

Cartwright D, Chilton C, Benson D. 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia* strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. Appl Microbiol Biotechnol. 43:211-216.

Chen Y, Xu X, Liang J, Lin H. 2013. Relationship between climate conditions and nosocomial infection rates. Afr Health Scienc, 13: 339–343.

Du Fall LA, Solomon PS. 2011. Role of Cereal Secondary Metabolites Involved in Mediating the Outcome of Plant-Pathogen Interactions. Metabolites. 1: 64–78.

Góis C G M, Lopes-Santos L, Beranger J P O, de Oliveira A G, Spago F R, Andrade G. 2013. The Control of *Lactobacillus* sp. by Extracellular Compound Produced by Pseudomonas aeruginosa in the Fermentation Process of Fuel Ethanol Industry in Brazil. J Sustainable Bioen Syst. 3: 194-201.

Gross HA, Loper JB. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep.* 26: 1408–1446.

Hawkey PM. 2008. The growing burden of antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 62: 1-9.

Hwang J, Chilton W, Benson D. 2002. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. Biol Control 25:56–63.

Kerbauy G, Vivan ACP, Simões G, Simionato A, Pelisson M, Vespero E, Costa S, Andrade C, Barbieri D, Mello J, Morey A, Yamauchi L, Yamada-Ogatta S, Oliveira A, Andrade. 2016. Effect of a Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. Curr Pharmac Biotech. 17: 389-397.

Lee C-h, Kim S, Hyun B, Suh J, Yon C, Kim C, Lim Y. 1994. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. J Antibiot. 47:1402–1405.

Levy SB. 2005. Antibiotic resistance – the problem intensifies. Adv Drug Deliv Ver. 57: 1446– 1450.

Martin JF, Demain AL. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol Rev. 44: 230–251.

Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod. 70: 461-477.

Paterson DL. 2006. Resistance in Gram-negative Bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Med. 119: 20-28.

Roitman J N, Mahoney N E, Janisiewicz W J. 1990. Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia.* Appl Microbiol Biotechnol. 34: 381-386.

Seleem D, Chen E, Benso B, Pardi V, Murata RM. 2016. *In vitro* evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms. Peer J. 4: 2148.

Siegel JD et al. 2007. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_isolation.html>

Vasconcellos F C S, de Oliveira A G, Lopes-Santos L, Beranger J P O, Cely M V T, Simionato A S. (2014). Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. pruni. Agric. Sci. 5: 71–76.

Vial L, Groleau MC, Dekimpe V. 2007. Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. J Microbiol Biotechnol. 17: 1407–1429.

ARTIGO B

Antagonistic effects of a *Burkholderia* sp. strain on germination, ultrastructure and metabolism of *Sclerotinia sclerotiorum*

*Ana Carolina Polano Vivan[1], Ane Stéfano Simionato[1], Bárbara Gionco[1], Eliandro Reis Tavares[1], Janaína Emiliano[2], Marcos Pileggi[2], Camila Rizek[3], Silvia Figueiredo Costa[3], Admilton Gonçalves de Oliveira Junior[1], Galdino Andrade Filho[1]

1 Department of Microbiology - Biological Science Center - State University of Londrina (UEL) – Brazil
2 Post Graduate Program in Evolutionary Biology - University of Ponta Grossa (UEPG) – Brazil
3 Institute of Tropical Medicine , Medical Research Laboratory (LIM -54) - University of São Paulo (USP) – Brazil

*Corresponding-author: andradeg@uel.br

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is a filamentous fungus that attacks over 400 species of plants, drastically reducing agricultural productivity. In this scenario, the use of natural products is very promising, increasing the chances of success against infection. The purpose of this particular work is to evaluate antifungal activity of secondary metabolites produced by a strain of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) against *S. sclerotiorum*, and suggest the mechanisms by which this inhibition occurs. It presented excellent activity by initial tests, for hyphae inhibition, sclerotia germination and hyphae in liquid medium. In Scanning Electronic Microscopy images, changes were observed in the ultrastructure and morphology of *S. sclerotiorum*. Our work shows that the fungus showed a characteristic enzymatic profile to respond to accumulation of reactive products, H_2O_2 and MDA. RV1R2 has great potential for antifungal metabolites production, and more studies are needed to find out which molecules are responsible for such activity.

Key words: *Burkholderia cepacia*, Natural products, *Sclerotinia sclerotiorum*

1 Introduction

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary is a phytopathogenic fungi with a wide variety of hosts such as soybean, oilseed rape, lettuce, tomato, sunflower, pea and others (Garg et al. 2010). Infection of plants by this fungus is associated with dozens of disease names, such as cottony rot, stem rot and white mould (Purdy 1979; Bolton et al. 2006). *S. sclerotiorum* is a necrotrophic microorganism, therefore obtain nutrients from dead tissues, and is able to persist for long periods in the environment, ruining cultures (Amselem et al. 2011). In Brazil, due to the great economic importance of soybean and bean, for example, it proves to be increasingly important a white mold control alternative. One of the factors that collaborate to the persistence of *S. sclerotiorum* in soils is the production of sclerotia, long survivability structures, who may germinate after years (Willetts & Wong 1980; Adams & Ayers 1979). Some chemical fungicides such as carbendazim, fluazinam and vinclozolin have shown good control potential against the white mold pathogen, both *in vitro* and *in vivo*, as reported by several studies (Spitzer et al. 2012; Mueller et al. 2002; Sumida et al. 2014). On the other hand, studies have been done to assess the environmental impact of agricultural pesticides in water, sediment and biota. The results were not encouraging, since fungicides have proven to be accumulated in environment systems (Ccanccapa et al. 2016; Belgers et al. 2009). In this scenario, alternatives such as lower environmental impact strategies should be considered to combat this pathogen that causes such agricultural destruction and economic losses. Genus

Burkholderia species contain species with important biotechnological applications by their extensive metabolic diversity (Chiarini et al. 2006). The purpose of this work is to evaluate the antifungal activity of secondary metabolites produced by a strain of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) against *S. sclerotiorum*, and suggest the mechanisms by which this inhibition occurs.

2. Results and discussion

2.1 IDENTIFICATION OF THE ANTAGONISTIC STRAIN RV1R2

Preliminary identification by automated system Vitek® (BioMérieux) indicated 94% probability of RV1R2 strain belongs to *B. cepacia* group (Bcc). As it is a biochemical profile analysis, sequencing of 16S fragment was performed for confirmation, showing the same result as the computerized system. As Bcc complex comprises several species, the strain was subjected to *fur* gene sequencing, specific technique to identify members of this bacteria complex. The sequencing showed homology to two different species*, B. cepacia* and *B. pyrrocinia*. For final and definitive identification, a PCR reaction was performed with specific primers for these two species, showing that RV1R2 is a *B. pyrrocinia* strain. The bacterial species belonging to *B. cepacia* complex (Bcc) are extensively studied in relation to its antimicrobial activity, particularly against phytopathogenic fungi, as *Rhizoctonia solani, Pythium* spp*., Fusarium* spp., among others (Quan et al. 2006; Cartwright et al. 1995). These species as well as species of *Pseudomonas* sp. produce important secondary metabolites as pyrrolnitrin, phenazine and other active compounds (Hwang et al. 2002; Cartwright et al. 1995; Meyer et al. 1989; Roitman et al. 1990). Its precise identification to species level is laborious, due to extreme genetic similarity between species belonging to the complex, and often more than one technique must be applied (Reik et al. 2005; Ramette et al. 2005; Mahenthiralingam et al. 2005).

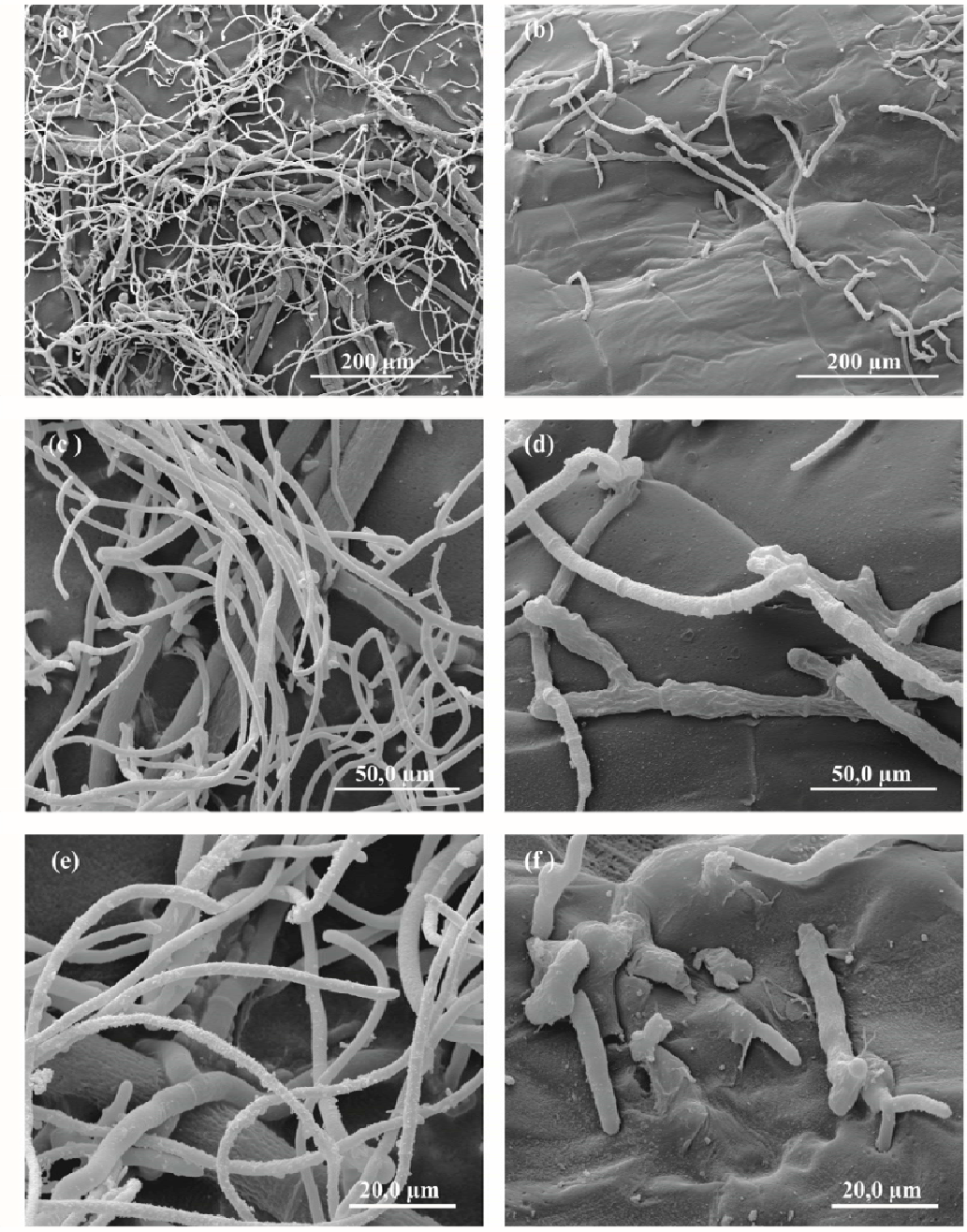
2.2 *ANTIFUNGAL ACTIVITY*

When confronted directly, *S. sclerotiorum* was inhibited by RV1R2 strain, showing the first signs that the latter would produce a substance or group of substances that have strong antifungal activity. Thus, the next step was testing the antifungal activity of the cell-free culture supernatant. In three experiments, the mean inhibition of mycelial growth was 64% compared to control. Activity of FDR fraction on paper discs (500µg) obtained mycelial inhibition of approximately 63% compared to control. The three minimum inhibitory concentration (MIC) experiments in solid medium presented the value of 125 ug/mL. These data were subsequently used in preparation of electron microscopy experiment. However, the experiments of sclerotia germination inhibition showed lower MIC values: 62.5 ug/mL. MIC values of liquid medium experiment were even lower (31,25 ug / mL) than in solid medium. These results were employed on oxidative stress experiments. Results shown from the direct antagonism (strain - strain) to the minimum inhibitory concentration test indicate that RV1R2 strain produces one or more secondary metabolites released out of the cell with inhibition ability against *S. sclerotiorum*. The inhibitory activity of sclerotia germination present in FDR fraction takes a great advantage in controlling the disease in the field. Its eradication would mean a major impact on long-term agricultural production.

2.3 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

In the Scanning Electron Microscopy (SEM) images, changes were observed in the ultrastructure and morphology of *S. sclerotiorum*. Some observed changes were drastic decrease in the amount of thinner hyphae, distortion and depressions on the surface of the agglomerates. This can clearly be seen in figure 1. This was probably caused by metabolites produced by RV1R2 strain. Information about the behavior of fungal cell structures affected by FDR- treatment are still lacking.

Fig. 1. Scanning eletron micrographs of *Sclerotinia sclerotiorum* hyphae treated and untreated with FDR (a) control 400 x (b) treated 400 x (c) control 1500 x (d) treated 1500 x (e) control 3000 x (f) treated 3000 x



2.4 OXIDATIVE STRESS

S. sclerotiorum, when grown in the presence of FDR, shows increased production of hydrogen peroxide (H_2O_2) compared with BDC and DMSO controls, from the lowest concentration tested (0.98 ug/mL), remaining constant in other concentrations. Malondialdehyde (MDA) rise also begins to be observed at a concentration of 0.98 ug/mL. Statistical analysis of H_2O_2 and MDA levels are consistent with the findings, showing significant results with concentrations above 0.98 ug/mL. In relation to the antioxidative system, the gels showed three types of SOD isoenzymes in *S. sclerotiorum*, Mn –SOD I, Mn -SOD II and Fe -SOD (figure 2). The gel shows that there are no significant differences in the activities of the two isozymes Mn- SOD in the treatment and control. Fe- SOD shows less activity in PDB (potato dextrose broth) and DMSO (dimethyl sulfoxide) control gels, then a increase can be seen in SOD activity from the concentration 0.98 g/mL, but it has a decrease as the FDR concentration increases (figure 3).

Fig. 2. Non-denaturing PAGE gel for SOD isoforms in *Sclerotinia sclerotiorum*, after incubation with FDR. **Control:** revealed untreated gel. **H_2O_2 :** revealed H_2O_2 treated gel. **KCN:** revealed KCN treated gel.

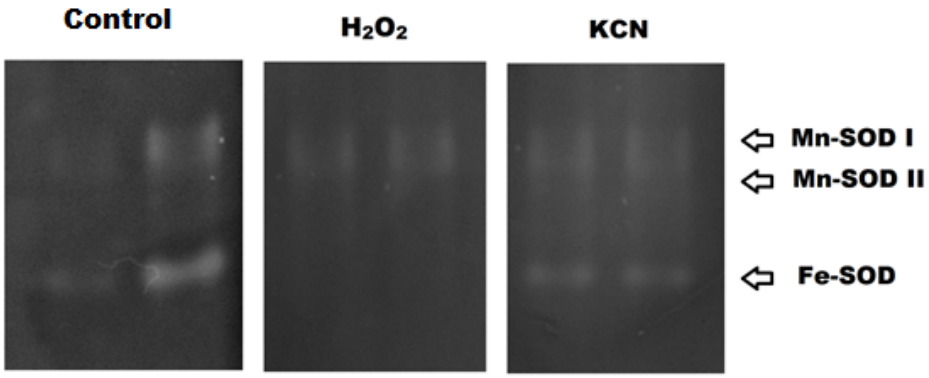
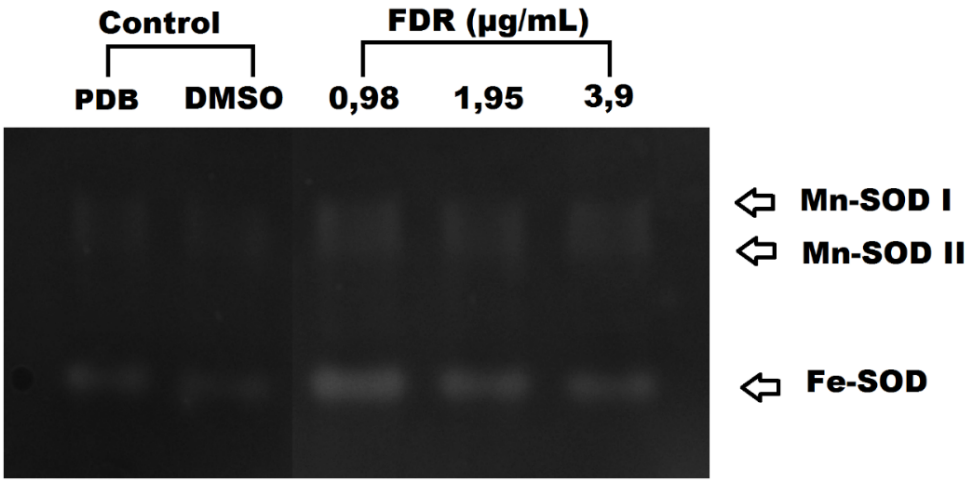
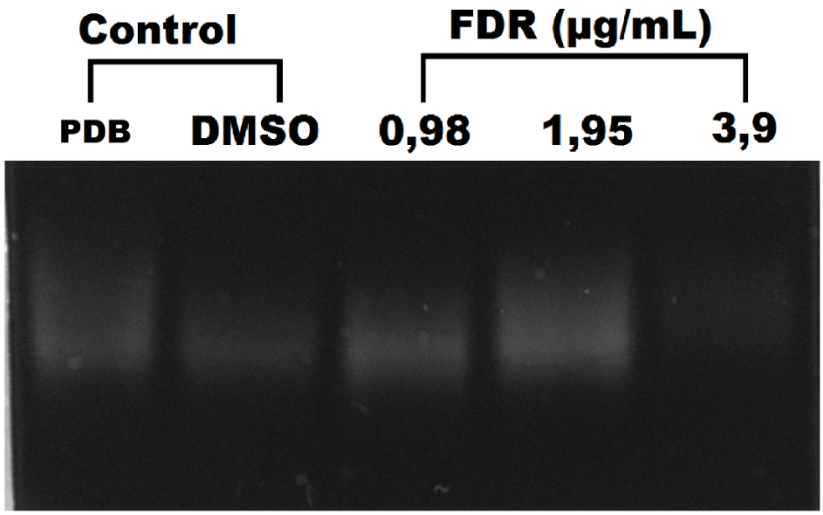


Fig. 3. SOD gel of *Sclerotinia sclerotiorum* incubated with FDR. **Control:** PDB (potato dextrose broth) and DMSO (Dimethyl sulfoxide). **FDR (µg/mL):** 0.98, 1.95 and 3.9 µg/mL.



CAT profile observed indicates that *S. sclerotiorum* has only one CAT isoform, which showed an increase of its activity at concentrations 0.98 and 1.95 ug/ml, then decreased activity at a concentration 3.9 mg/mL (figure 4).

Fig. 4. CAT gel of *Sclerotinia sclerotiorum* incubated with FDR. **Control:** PDB (potato dextrose broth) and DMSO (Dimethyl sulfoxide). **FDR (µg/mL):** 0.98, 1.95 and 3.9 µg/mL.



According to Cabiscol et al. (2000), living organisms have some mechanisms to protect themselves against oxidative stress, and a way to it is to produce enzymes such as catalase and superoxide dismutase (Cabiscol et al. 2000). Our work shows that the fungus *S. sclerotiorum* showed that enzymatic profile to respond to accumulation of reactive products, H_2O_2 and MDA. There is a proportionality between the hydrogen peroxide and lipid peroxidation levels in the fungal cell in the presence of FDR. Hydrogen peroxide levels show correlation with the data obtained through the gel SOD. For as seen, the SOD activity is increased in the presence of FDR, and as a result the hydrogen peroxide levels increase, and with them the lipid peroxidation. However, CAT activity decreased in concentration 3,9 mg/mL FDR , featuring a situation of oxidative stress which may have led to inhibition of fungal growth. This stress was probably caused by the action of FDR extract, as confirmed by the results of electron microscopy.

3. Experimental

3.1 Screening of antagonistic bacterial strain

Bacterial strains obtained from soil samples collected in Rio Verde, Itararé-SP, Brazil (S 24 ° 05'04.8 "; W 049 ° 12'06.0 ' ') were submitted to antagonistic tests at Microbial Ecology Laboratory (UEL). Among them, the strain RV1R2 was chosen for this research for its preliminary good results in inhibiting growth of a variety of microorganisms, concerning Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. The strain was cryopreserved in 30% glycerol and 70% Kings B broth by Microbial Ecology Laboratory, UEL, Londrina, Brazil.

3.2 IDENTIFICATION OF THE ANTAGONISTIC STRAIN RV1R2

The isolate was grown in nutrient agar and incubated for 48 h at 28 ºC for its preliminary identification by automated system Vitek® (BioMérieux). The equipment access biochemical information of the strain, confronting it with a data bank, providing a phenotypic identification. To accurately characterize the isolate, 16S molecular technique was employed. The extraction was performed by Kit - Axy prep bacterial Genomic DNA miniprep kit (from Axygen), and for purification the Kit - PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (from Axygen) was employed. The sequencing method was Sanger (capillary electrophoresis) by Applied Biosystems 3500 xL sequencer at Soil Biotechnology Laboratory – EMBRAPA (Londrina-PR). In face of great genetic diversity among species of *Burkholderia cepacia* group (Bcc), a specific assay for this group was tested (Lynch & Dennis 2008; Boszczowski et al. 2014). Sequencing was performed at MegaBACE 1000 (ABI 3730 DNA Analyser; Applied Biosystems, Alameda, CA), in São Paulo State University Campus (USP-SP). To finalize molecular identification of RV1R2, specific PCR was performed for two species of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc): *Burkholderia cepacia* , and *Burkholderia pyrrocinia* (Lynch & Dennis 2008).

3.3 BACTERIAL CULTIVATION AND PRODUCTION OF TEST SUBSTANCES

An inoculum corresponding to 10^7 cells/mL of RV1R2 strain was grown in KB modified broth for 7 days, under constant aeration flow. Bacterial cells were removed by centrifugation at 9000 rpm for 20 minutes, and the supernatant was concentrated on rotaevaporator to 1/10 of its initial volume. This concentrated supernatant (SN) was then subjected to extraction by dichloromethane (DM) by liquid-liquid partition separating funnel (10 times each SN aliquot of 100 ml for 200 ml of DM). The resulting extract was called FDR (dichloromethane fraction), concentrated in rotaevaporator under reduced pressure and lyophilized.

3.4 MICROORGANISMS (PATHOGEN)

S. sclerotiorum strain used for the assays was courtesy from Phytopathology Laboratoratory-Agricultural Sciences Center, UEL. It was mantained in potato dextrose agar (PDA), at 20 °C, with 12 h photoperiod, and weekly samplings were made to ensure the viability of the strain.

3.5 TEST FOR ANTIFUNGAL ACTIVITY

S. sclerotiorum and RV1R2 were tested for antagonism check between the strains. They were grown in PDA medium at opposite plate ends, and incubated at 20°C for 7days with 12h photoperiod (All subsequent experiments were performed in these conditions). Plates with only *S. sclerotiorum* were negative control experiment. The growth was monitored daily. The final measurement was done at day 3, when the mycelium took the plate (All subsequent experiments were performed in these conditions). In order to investigate the production of secondary metabolites with antifungal properties, the culture broth was tested. Cells were removed by centrifugation, and the supernatant was concentrated to 1/10 of the initial volume. The antifungal activity of RV1R2 supernatant against *S. sclerotiorum* was screened by agar diffusion assay (Vasconcellos et al. 2014). Modified KB was used as

negative control media. The experiment was performed in triplicate, at 3 different ocasions (3 experiments). After the extraction with organic solvents, the crude extract (FDR) was tested against *S. sclerotiorum* to verify its activity. The disk diffusion method was performed (Gois et al. 2013). The experiment was performed in triplicate, at 3 different ocasions (3 experiments). According to results of disk diffusion, an experiment of minimal inhibitory concentration (MIC) was conducted to assess more accurately the inhibition of hyphae and sclerotia. FDR was diluted in 0.5% DMSO and the experiments consisted of different concentrations of the extract incorporated to PDA plates: 0.97, 1.95, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125 and 250 µg/mL. Colony plugs of *S. sclerotiorum* were positioned in the center of them for hyphae assay. *S. sclerotiorum* plates were incubated for 7 days to obtain material for sclerotia assay. They were desinfected with 70% alcohol and sodium hypochlorite 2%, and placed in the plates center. The control plates were PDA only, and PDA + DMSO. The experiment was performed in triplicate, at 3 different ocasions (3 experiments). MIC test in liquid media was performed to confirm the hypothesis that greater surface contact with the hyphae increases the activity of the fraction. Same agar dilution FDR concentrations were used at this experiment. FDR was diluted in 0.5% DMSO and the experiments consisted of different concentrations of the extract incorporated to potato dextrose broth (PDB) falcon tubes (20 mL): 0.97, 1.95, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125 and 250 µg/mL. The tubes were incubated at 20 ° C for 7days with 12h photoperiod, under stirring of 100 rpm. The experiment was performed in triplicate, at 3 different ocasions (3 experiments). Fungal growth was observed daily, and the tubes with apparent hyphae growth were compared to the control tubes (only PDB).

3.6 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

Three day-old fungal cultures on PDA treated with the crude extract (FDR) at concentration of 62,5 µg/mL was used for all SEM observations. About 6 mm-diameter segments were cut from cultures growing on PDA plates and promptly placed in vials containing 3% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0,1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at 4 ºC. Samples were kept in this solution for 4 h for fixation and then washed with 0,1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) three times for 10 min each. Subsequently, the samples were dehydrated in an ethanol series (70%, 80%, 90% and 100%) three times for 5 min each. Samples were critical-point dried with CO_2 (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and observed in a FEI Quanta 200 SEM operating at 30 kV.

3.7 OXIDATIVE STRESS

Hydrogen peroxide levels (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) were quantified to perform the oxidative stress tests. *S. sclerotiorum* was incubated on potato dextrose broth (PDB) added with active fraction, at concentrations lower than found for MIC in broth as well as the PDB and PDB + 0.5% DMSO controls. After the growth period, the mycelium was vacuum filtered and frozen. The amount of hydrogen peroxide (H_2O_2) was determined by potassium iodide (KI) reaction (Alexieva et al. 2001). The hyphae concentrate was macerated in liquid nitrogen (N_2), and 0.3 g of macerate were homogenized with 1 ml trichloroacetic acid (TCA) 0,1 % and centrifuged at 10,000 g for 15min at 4 °C . 200 uL of the supernatant were taken, and added 200 uL of potassium phosphate buffer (TFP) 100 mM (pH 7.5) and 800 uL of potassium iodide solution (KI) 1 M. The solution was kept in the dark at 4 °C for 1h and then the absorbance was measured in spectrophotometer (390 nm). The results were expressed in mmol per gram. The lipid peroxidation was determined by quantification of malondialdehyde (MDA) production, a reactive metabolite to 2-thiobarbituric acid (TBA) (Health & Parker 1968). The hyphae concentrate was macerated with N_2, and 0.3 g of cell homogenate was macerated with 1 ml of 0.1 % TCA and centrifuged at 10,000 g for 5 minutes. 250 uL of the supernatant were taken, to which was added 1 mL of 20 % TCA solution + 0.5 % TBA. The solution

was placed in a water bath at 97 ° C for 30min and then cooled to 4 °C for 10min. The absorbance was measured in a spectrophotometer at 535 nm and 600 nm. The amount of MDA was expressed in mmol per gram.

H_2O_2 and MDA quantification data was obtained randomly in triplicate and analyzed for statistical analysis. The significance of diferences was assessed by variance analysis ($p<0.05$). The analysis were performed using Stata 12 software by Bonferroni test.

3.8 ANTIOXIDATIVE SYSTEM

The concentrate hyphae was macerated in N_2 and homogenized in TFP 100mM pH 7.5 containing ethylene diamine tetraacetic acid 1 mM (EDTA), 3 mM dithiothreitol (DTT) and 5 % polyvinylpyrrolidone (PVPP) , and kept at 4 ° C (24). After homogenization, the material was centrifuged at 10,000 g at 4 °C for 30 minutes, and the supernatant was stored in aliquots at - 80 ° C for subsequent enzyme analysis. The method described by Bradford (1976) was used to determine total protein concentrations (Bradford 1976). Spectrophotometry was used at 595 nm and BSA (" Bovine Serum Albumin ") was the standard . The results were expressed in mg / mL. The activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were determined by electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gels (PAGE). Gels were used with 12 % polyacrylamide (Azevedo et al. 1998). The resolving gel was assembled with 2.5 ml solution of polyacrylamide 40 % (Sigma) , 2.5 ml of 3M TRIS buffer pH 8.9, 4.5 ml of distilled water. 17.5 uL of TEMED and 25 uL of ammonium persulfate 1 % were used as catalysts. A solution composed of 500 uL 40 % polyacrylamide solution (Sigma) , 1.25 ml of 500 mM Tris pH 6.7 , 2.75 mL of water, 10 uL TEMED and 50 uL ammonium persulfate 1 % was used for packaging gel. The electrode buffer was composed of 25 mM Tris pH 8.3 plus 192 mM glycine. The SOD activity was evaluated in non- denaturing PAGE gel. 40 ug of protein were applied in non-denaturing PAGE gel along with a sample buffer (1 ml of 500 mM Tris-HCl buffer pH 6.7 , 1 ml glycerol and 1 ml of 0.5% solution bromophenol blue). Gels were subjected to a constant current of 15 mA at 4 ° C for 3h . After separation of the proteins , the SOD activity was determined (Beuchamp &

Fridovich 1971). At the end of running time, the gels were washed with deionized water and incubated in the dark at room temperature in a reaction mixture containing 50 mM TFP pH 7.8 , 1 mM EDTA, riboflavin 0.05 mM nitroblue tetrazolium (NBT) 0.1 mM and 0.3 % TEMED for 30min . After this period the reaction mixture was discarded, the gels washed with deionized water and exposed under fluorescent light for the appearance of bands. For the characterization of SOD isoenzymes, 40 ug of protein of the same sample were applied at intervals between applications in polyacrylamide gel, which was divided vertically into three parts equal after the electrophoretic run. A portion was immersed in 100mM pH 7.8 TFP, the second part immersed in 100 mM solution of TFP pH 7.8 containing 0.0292 g of EDTA and 0.0130 grams of KCN, and the latter was immersed in a solution TFP 100 mM pH 7.8 plus 0.0292 g of EDTA and 70 uL of H2O2 30%, remaining immersed in the respective processing solutions for 20min in the dark. Gels were washed in deionized water and subjected to development in a solution containing 50 mM TFP pH 7.8, 1 mM EDTA, riboflavin 0.05 mM nitroblue tetrazolium (NBT) and 0.1 mM TEMED 0.3% in 30min. After this period the reaction mixture was discarded, the gels washed with deionized water and exposed under fluorescent light for the detection of bands.The bands were analyzed for the type of isoenzyme , according to inhibiting factor in the treatment solutions (Guelfi et al. 2011) : Cu / Zn -SOD when inactivated in the presence of KCN and H_2O_2 ; Fe- SOD if the band was only inactivated in the presence of H_2O_2, being resistant to KCN ; and Mn -SOD isoenzyme was was resistant to both treatments (Azevedo et al. 1998). The CAT activity was evaluated in non- denaturing PAGE gel. 40 ug of protein samples were applied in non-denaturing PAGE gel with a sample buffer (1 ml of Tris-HCl buffer 500 mM pH 6.7 1 ml glycerol solution and 1 mL 0.5 % bromophenol blue). The determination of CAT activity was performed in 12% PAGE at 4 ° C for 17h in constant current of 15 mA. The gel was washed with deionized water (3 X 15 min) and incubated for 10 minutes in 0.003 % solution of H2O2 (v / v) at room temperature. Then the gel was washed in deionized water and placed for 10 minutes in solution of 1 % $FeCl_3$ and K_2Fe (CN6) 1 % (w / v) , then the solution was removed and the gel washed with deionized water. The fixation was performed with a solution of acetic acid (7%) for 15min (Azevedo et al. 1998).

4. Conclusion

Chemical analysis of FDR is needed to identify the possible molecules responsible for the antifungal activity. This identification is important to clarify whether this activity is related to some unpublished or already described molecule. According to the inventory made by Vial (2007), most *Burkholderia* strains do not have both antifungal and antibacterial activities (Vial 2007). As this extract presents this profile, we suggest an unprecedented compound, an association of compounds or even synergism.

References

Adams PB, Ayers WA. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. Phytopath. 69: 896-899.

Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant, Cell & Environ. 24: 1337–1344.

Amselem J, Cuomo CA, Kan JAL et al. 2011. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia Sclerotiorum* and *Botrytis Cinerea*.. PLoS Genetics 7.8

Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ. 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. Physiol Plant. 104:280-292.

Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem. 44: 276-287.

Belgers JD, Aalderink GH, Van den Brink PJ.2009. Effects of four fungicides on nine non-target submersed macrophytes. Ecotoxicol Environ Saf. 72:579-84.

Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD.2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Mol Plant Pathol. 7: 1-16.

Boszczowski I, do Prado G V B, Dalben M F, Telles RCP, Freire MP, Guimarães T, Levin, AS. 2014. Polyclonal outbreak of bloodstream infections caused by *Burkholderia cepacia* complex in hematology and bone marrow transplant outpatients units. Rev Inst Med Trop de São Paulo, 56: 71–76.

Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254.

Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int Microbiol. 3: 3–8.

Cartwright D, Chilton C, Benson D. 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia* strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. Appl Microbiol Biotechnol. 43:211-216.

Ccanccapa A, Masiá A, Navarro-Ortega A, Picó Y, Barceló D. 2016. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. Environ Pollut. 211:414–424.
Chiarini L, Bevivino A, Dalmastri C, Tabacchioni S, Visca P. 2006. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. Trends in Microbiol. 14: 277–286.

Feng-Xia L, Hui-Quan M, Liu J, Zhang C. 2012. Antagonistic effects of Bacillus cereus strain B-02 on morphology, ultrastructure and cytophysiology of Botrytis cinerea. Pol J Microbiol. 61:119-128.

Garg H, Li H, Sivasithamparam K, Kuo J, Barbetti MJ. 2010. The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of a resistant and a susceptible genotype of *Brassica napus*. Ann Bot. 106(6):897-908.

Góis CGM, Lopes-Santos L, Beranger JPO, de Oliveira AG, Spago FR, Andrade G. 2013. The Control of *Lactobacillus* sp. by Extracellular Compound Produced by Pseudomonas aeruginosa in the Fermentation Process of Fuel Ethanol Industry in Brazil. J Sustainable Bioen Syst. 3: 194-201.

Ghelfi A, Gaziola S A, Cia M C, Chabregas S M, Falco M C, Kuser-Falcão P R, Azevedo R A. 2011. Cloning, expression, molecular modelling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. Annals of Appl Biol, 159: 267–280.

Heath R L, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys. 125: 180–198.

Hwang J, Chilton W, Benson DM. 2002. Pyrrolnitrin production by*Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. *Biol Control* 25: 56–63.

Lynch K H, Dennis JJ. 2008. Development of a Species-Specific *fur* Gene-Based Method for Identification of the *Burkholderia Cepacia* Complex . J Clin Microbiol. 46: 447–455.

Mahenthiralingam E, Urban T A, Goldberg J B. 2005. The multifatorious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. Nat Rev Microbiol. 3: 144-156.

Meyer J M, Hohnadel D, Halle F. 1989. Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. J Gen Microbiol. 135: 1479 – 1487.

Mueller DS , Dorrance AE , Derksen RC ,Ozkan E, Kurle JE , Grau CR, Gaska JM ,Hartman GL , Bradley CA , Pedersen WL. 2002. Efficacy of fungicides on Sclerotinia sclerotiorum and their potential for control of sclerotinia stem rot on soybean. Plant disease. 86.

Purdy LH. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. Phytopathology. 69:875-880.

Quan C S, Zheng W, Liu Q, Fan S D. 2006. Isolation and characterization of a novel Burkholderia cepacia with strong antifungal activity against Rhizoctonia solani. App Microbiol Biotechnol. 72: 1274–1284.

Ramette A, LiPuma JJ, Tiedje JM. 2005. Species Abundance and Diversity of *Burkholderia cepacia* Complex in the Environment. Appl Environ Microbiol. 71:1193-1201.

Reik R, Spilker T, LiPuma JJ. 2005. Distribution of *Burkholderia cepacia* Complex Species among Isolates Recovered from Persons with or without Cystic Fibrosis. J ClinMicrobiol. 43:2926-2928.

Roitman JN, Mahoney NE, Janisiewicz WJ. 1990. Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia.* Appl Microbiol Biotechnol. 34: 381-386.

Spitzer T, Matušinsky P , Klemová Z, Kazda J. 2012. Effect of Fungicide Application Date against Sclerotinia sclerotiorum on Yield and Greening of Winter Rape. Plant Protect. Sci. 3: 105–109.

Sumida CH, Canteri MG, Peitl DC, Orsini IP, Tibolla F, Araújo FA, Chagas DF. 2014. Inibição micelial in vitro de *Sclerotinia sclerotiorum* por fungicidas. Summa Phytopathol, 40: 90-91.

Vasconcellos FCS, de Oliveira AG, Lopes-Santos L, Beranger J P O, Cely M V T, Simionato A S. 2014. Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. pruni. Agric. Sci. 5: 71–76.

Vial L, Groleau MC, Dekimpe V. 2007. Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. J Microbiol Biotechnol. 17: 1407–1429.

Willetts H J, Wong JA. 1980. The Biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with Emphasis on Specific Nomenclature. Bot Re., 46: 101-165.