

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA  
ESCOLA NORMAL SUPERIOR  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**JOYCE BELENTANI DE SOUZA MACIEL**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL  
PARA CONTROLE BIOLÓGICO**

Manaus - AM  
2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

m152i Maciel, Joyce Belentani de Souza  
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA CONTROLE  
BIOLÓGICO / Joyce Belentani de Souza Maciel. Manaus :  
[s.n], 2019.  
35 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura  
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

Inclui bibliografia

Orientador: Ieda Hortencio Batista

Coorientador: Gilvan Ferreira da Silva

1. Actinobactérias. 2. Antimicrobiano. 3. Controle  
biológico. I. Ieda Hortencio Batista (Orient.). II. Gilvan  
Ferreira da Silva (Coorient.). III. Universidade do Estado  
do Amazonas. IV. IDENTIFICAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL  
PARA CONTROLE BIOLÓGICO

JOYCE BELENTANI DE SOUZA MACIEL

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL  
PARA CONTROLE BIOLÓGICO**

Relatório final de conclusão de curso,  
apresentado à Universidade do Estado do  
Amazonas - UEA, como parte das  
exigências para a obtenção do grau de  
licenciatura em Ciências Biológicas.

Manaus, 13 de novembro de 2019

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Gilvan Ferreira da Silva

---

Dr<sup>a</sup>. Josenilda Carlos dos Santos

---

Prof. Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior

## **EPÍGRAFE**

.....O nosso amadurecimento individual é alcançado por meio de escolhas que fazemos ao longo de nossas vidas e fugir de escolhas difíceis é um comportamento de avestruz, que envia a cabeça em um buraco para não ver o que ocorre ao seu redor..... – DNA segredos & mistérios.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Ao meu pai, meu avô e minha irmã que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida e toda minha família pelo apoio e torcida e por estarem ao meu lado sempre que possível.

A todos os meus amigos pelas palavras de incentivo nas horas difíceis.

Ao Doutor Gilvan Ferreira da Silva pela paciência na orientação e incentivo que tornou possível esse projeto.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a conclusão da graduação, em especial à Professora Ieda Hortência Batista.

Aos colegas do laboratório pela convivência, amizade e aprendizado em especial Karina Bichara, Jefferson Cruz por toda a paciência e ajuda que me deram.

As bolsas e fomentos que me financiaram nessa jornada. A Embrapa por disponibilizar o laboratório para realização da pesquisa.

## **RESUMO**

O controle biológico por meio do uso de microrganismos é uma alternativa para diminuir o uso de defensivos químicos no controle de fitopatógenos, que afetam plantas de interesse agrícola. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi identificar e quantificar o potencial de inibição de bactérias previamente selecionadas contra fungos fitopatogênicos. Foram avaliados oito microrganismos, sendo três isolados endofíticos obtidos de raízes do guaranazeiro (PcA1, PcA2, PcA3) e cinco isoladas de sedimentos do Rio Madeira (MAD 24, MAD 42, MAD 51, MAD 189 e MAD 207). Estes foram identificados por meio de análise morfomolecular, com base em dados de microscopia eletrônica de varredura e sequenciamento da região 16S rDNA. O potencial de inibição (PIC) contra quatro fitopatógenos: *Colletotricum siamense*, *Pseudopestalotiopsis gilvanis* sp. nov., *Neopestalotiopsis formicarum* e *Fusarium decemcellulare*, foi obtido *in vitro* por meio da metodologia de cultura dupla, em meio BDA. A média do percentual de inibição (PIC) após 10 dias variou de 46% a 74% dependendo da bactéria testada. Os isolados PcA1, PcA2, PcA3 e MAD207 apresentaram melhor desempenho contra *F. decemcellulare* (71%±2.8, 64%±1.7, 72±4.5 e 78%±1, respectivamente). O isolado MAD24 apresentou melhor desempenho contra *N. formicarum* (72% ±0.5), MAD42 e o MAD51 contra *C. siamense* (72% ±0.5; 74% ±2.4), e MAD189 contra *N. formicarum* (69% ±0.5). Os isolados PcA1, PcA2, PcA3 e MAD207 foram identificados, com base na análise de sequência região 16S, como membros do gênero *Bacillus*, estes foram relacionados filogeneticamente a *B. amyloliquenfaciens*, *B. subtilis*, *B. nakamurai* e *B. velezensis* respectivamente. Dados de microscopia eletrônica de varredura revelaram morfologia diferente para cada isolado, o que sugere que estes pertencem a diferentes espécies. Os Isolados MAD24, MAD42, MAD 51 e MAD189 foram identificados como membros do gênero *Streptomyces*. As amostras MAD189 e MAD42 foram filogeneticamente mais relacionadas entre si e formaram um clado separado, MAD51 mostrou baixa relações filogenéticas com as espécies analisadas e MAD24 foi agrupado no clado de *S. costaricanus*, *S. griseofuscusmurinus*. Os dados morfológicos corroboram com as inferências moleculares e diferenças de tamanho e forma foram identificadas em todos os isolados.

Palavras-chave: Actinobactérias; Antimicrobianos; Controle biológico.

## ABSTRACT

Biological control through the use of microorganisms is an alternative to reduce the use of pesticides in the control of plant pathogens, which affect plants of agricultural interest. In this context, the objective of this work was to identify and quantify the inhibition potential of previously selected bacteria against phytopathogenic fungi. Eight microorganisms were evaluated: three endophytic isolates obtained from guaranazeiro roots (PcA1, PcA2, PcA3) and five isolates from Madeira River sediments, from these four actinobacteria (MAD 24, MAD 42, MAD 51 and MAD 189). bacteria (MAD 207)). These were identified by morphomolecular analysis based on scanning electron microscopy and 16S rDNA region sequencing data. Inhibition potential (PIC) against four phytopathogens: *Colletotricum siamense*, *Pseudopestalotiopsis gilvanis* sp. nov., *Neopestalotiopsis formicarum* and *Fusarium decemcellulare*, were obtained in vitro using the double culture methodology in BDA medium. The mean percentage inhibition (PIC) after 10 days ranged from 46% to 74% depending on the bacteria tested. The isolates PcA1, PcA2, PcA3 and MAD207 performed better against *F. decemcellulare* ( $71\% \pm 2.8$ ,  $64\% \pm 1.7$ ,  $72 \pm 4.5$  and  $78\% \pm 1$ , respectively). The MAD24 isolate showed better performance against *N. formicarum* ( $72\% \pm 0.5$ ), MAD42 and MAD51 against *C. siamense* ( $72\% \pm 0.5$ ;  $74\% \pm 2.4$ ), and MAD189 against *N. formicarum* ( $69\% \pm 0.5$ ). PcA1, PcA2, PcA3 and MAD207 isolates were identified, based on sequence analysis of the 16S rRNA gene, as members of the *Bacillus* genus, which were phylogenetically related to *B. amyloliconefaciens*, *B. subtilis*, *B. nakamurai* and *B. velezensis* respectively. . Scanning electron microscopy data revealed different morphology for each isolate, suggesting that they belong to different species. Isolates MAD24, MAD42, MAD 51 and MAD189 were identified as members of the genus *Streptomyces*. Samples MAD189 and MAD42 were more phylogenetically related to each other and formed a separate clade, MAD51 showed low phylogenetic relationships with the analyzed species and MAD24 was grouped in the *constraricanus* clade, *S. griseofuscus murinus*. The morphological data corroborate the molecular inferences and differences in size and shape were identified in all isolates..

Keywords: Actinobacteria; Antimicrobials; Biological control.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	9
-------------------	---

<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
2.1 Rio Madeira.....	11
2.2 Controle biológico.....	12
2.3 <i>Streptomyces</i> .....	13
2.4 <i>Bacillus</i> .....	13
3. Objetivos.....	11
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
4.1 Reativação dos Fitopatógenos.....	14
4.2 Bactérias selecionadas.....	15
4.3 Obtenções de culturas puras e extração de DNA total.....	16
4.4 Identificações moleculares e análises filogenéticas.....	16
4.5 Teste de inibição direta .....	17
4.6 Caracterização morfológica e Microscopia eletrônica de varredura.....	17
4.7 Teste de amilase.....	18
4.8 Teste de lipase.....	18
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	18
5.1- Identificação molecular e caracterização morfológica dos isolados.....	19
5.2 Potencial inibitório de isolados do gênero <i>Bacillus</i> .....	24
5.3 Potencial inibitório de isolados do gênero <i>Streptomyces</i> .....	26
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	28
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29

## 1. INTRODUÇÃO



Doenças que acometem culturas de interesse agrícola são um problema para a produção de alimentos no mundo. Os patógenos causam mudanças nos processos fisiológicos, da planta em decorrência da infecção e estes distúrbios podem levar a morte do hospedeiro (BARROS et al., 2010). A região tropical possui um clima favorável aos fitopatógenos assim com a redução na produção. O uso de defensivos agrícolas tornou-se nos últimos anos a principal alternativo para o controle de pragas e doença no mundo (TORRES et al., 2004). Contudo, o uso de agroquímicos intermitente pode apresentar várias consequências como: riscos para a saúde humana afetando o sistema nervoso, os músculos e órgãos (JOKANOVIĆ et al., 2018; SABRA et al., 2015), além de causar dores de cabeça, náuseas e visões turvas ao agricultores que entram em contato direto com o produto, os riscos também ocorrem no meio ambiente, com contaminação dos solos, lençóis freáticos, habitat terrestre e marinho (CARVALHO, 2015; JAYARAJ et al., 2017).

O controle biológico é uma alternativa para reduzir ou eliminar o uso de defensivos químicos na agricultura, significa usar de um fenômeno por meio do uso de um organismo que atua como inimigo natural (REGO & ALMEIDA, 1998). Os inimigos naturais podem atuar como parasitas, predadores ou podem ser micro-organismos, que agem de forma antagônica frente a fitopatógenos.

O antagonismo é um efeito inibitório contra outros microrganismos e é resultante de uma competição por nutriente ou espaço, produzindo compostos que atuam como bactericidas, bacteriostático e fungicidas (SCHILLINGER et al., 1996; JOGAI AH et al., 2016; SILVA et al., 2018). As substâncias produzidas por antagonistas podem ser utilizadas na pós-colheita de frutas evitando a colonização de fungos e conseqüentemente seu apodrecimento, na preservação de alimentos para que tenham maior tempo de prateleira ou como fontes alternativas aos fungicidas de origem sintética (BARDIN et al., 2015; YUAN et al., 2017) Além disto, essas substâncias também atendem à demanda da indústria farmacêutica sendo essas, potentes antimicrobianos naturais, anti-tumorais e outros (XIANG et al., 2015. UZMA et al., 2018).

A microbiota adquirida dos solos e sedimentos possuem várias aplicações biotecnológicas, como produção de enzimas: lipases, amilases, proteases entre outras (WILLERDING et al., 2011), produção de pigmento (CELETINO & CARVALHO,

2014), hormônios vegetais e outras moléculas que promovem crescimento em plantas (LONGATTI et al., 2014) e atividade antimicrobiana (MOTA & CLADERA, 2004). Os sedimentos de rios também apresentam uma alta diversidade de microrganismos (KIM & SPAROVEK, 2007). Podendo assim ser uma fonte para prospecção de organismos como potencial biotecnológico.

Dentro dessa microbiota, o filo Actinobacteria, seguido dos fungos e demais grupos bacterianos estão entre os micro-organismos com maior potencial biotecnológico. Actinobactérias do gênero *Streptomyces* é responsável mais de 70% dos antibióticos produzidos atualmente, além disso, também são utilizados para controle biológico, através de efeitos antagonistas contra fitopatógeno (LAM et al., 2006; GEBREYOHANNES & FELEKE, 2013). Actinobactérias são bactérias gram-positivas, caracterizadas por produção de hifas e micélio além da formação de cadeia de esporos, possui um alto conteúdo G+C em seu genoma. Muitos desses micro-organismos são encontrados no solo, vivendo como parasitas ou saprófitos, e também podem ser encontrados em ecossistemas aquáticos e ambientes extremos.

Em 1940, houve a descoberta do primeiro antibiótico ligado às actinobactérias, chamado estreptomicina. Hoje, sabe-se que estas exibem genomas grandes (frequentemente maior que 8 Mb), o que pode estar relacionado à alta capacidade para produção de tantos metabólitos bioativos diferentes. Diversos gêneros, como *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* e *Actinoplanes*, são produtores de compostos usados nas indústrias farmacêutica, agrícola, veterinária e pecuária (WINK & MOHAMMADIPANAH et al., 2017).

Outro filo de grande importância na biotecnologia é o filo Firmicutes que tem grande importância na área médica, sendo ele responsável por 60% da microbiota intestinal (CRESCI, BAWDEN, 2015). Possui parede gram-positiva, baixo conteúdo G+C, ele compreende cerca de 270 gêneros (FURUHASHI et al., 2007). Entre eles o gênero *Bacillus* que possui forma de bastonete e produção de endósporos, umas de suas principais características, possui uma alta aplicação na biotecnologia como: produção de probióticos, de antibióticos (Bacitracina e polimixina), de inseticidas, antimicrobianos, surfactantes, degradação de amilases, entre outros (TURNBULL & KRAMER, 1991; LUDWIG & SCHLEIFER, 2009; CUTTING et al., 2011; FAN et al., 2017).

Em virtude da gama de aplicações derivadas de antagonistas, o presente trabalho visa analisar o potencial dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* na inibição de fitopatógenos, habilidades antagônicas de interesse agrícola para o estado do Amazonas. Além disto também foram realizadas análises morfológicas e moleculares que permitiram identificar o gênero e as relações filogenéticas dos antagonistas estudados.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Rio Madeira**

Pesquisas referentes a bacias hidrográficas tem sido progressiva no Brasil, aliás, possui-se a maior bacia hidrográfica do mundo: a Bacia Amazônica, que possui dimensões e características próprias. Dentro dessa bacia tem-se o Rio Madeira com cerca de 23% de contribuição, tornando-se o maior afluente da margem direita do Rio Amazonas. Este rio tem sua formação na porção andina, derivado do Rio Mamoré no Peru, e em terras brasileiras torna-se o Rio Madeira, banhando os estados de Rondônia, Mato Grosso e Amazonas (DE ARAÚJO et al., 2018). Três rios principais que se juntam para formar o Rio Madeira são: o Rio Beni, o Rio Guaporé, e o Rio Mamoré (ADAMY, 2016).

O Rio Madeira é classificado como rio de águas brancas, com o pH entre 6,5-7, alta condutividade elétrica e altas cargas de material em suspensão (MUNIZ et al., 2013). A heterogeneidade paisagística presente na bacia do rio Madeira garante alta diversidade por oferecer ambientes distintos como campinas, cerrados, florestas de terra firme e de várzea, buritizais, tabocais, e águas barrentas, pretas e transparentes.

### **2.2 Controle biológico**

O controle biológico é um fenômeno natural que consiste na regulação de populações de organismos vivos através de inimigos naturais. Essa técnica aplicada tem como objetivo controlar as pragas agrícolas e os insetos transmissores de doenças a partir do uso de seus inimigos naturais (PARRA et al., 2002). Esse método se embasa no estudo das relações dos seres vivos no meio ambiente.

As espécies agrícolas possuem inimigos naturais de grupos bastante diversificados, como insetos, vírus, fungos, bactérias, nematoides, protozoários, rickettsias, micoplasmas, ácaros, aranhas, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. (LANNA FILHO et al., 2010; NOUROZIAN, 2006). Inicialmente o controle biológico foi primeiramente utilizado para controlar insetos, ácaros e ervas daninhas, com o tempo, a aplicação do método tornou-se mais ampla para outros patógenos.

O controle biológico por microrganismos é um método alternativo para a redução ou eliminação do uso de agroquímicos no controle de fitopatógenos. A grande diversidade de microrganismos e suas atividades antagonistas podem ser de grande relevância. Muitos trabalhos vêm sendo elaborados com bactérias para elucidar as interações entre antagonista-patógeno-hospedeiro (FERRAZ et al., 2010; HALFELD-VIEIRA et al., 2006). Os gêneros de maior predominâncias de bactérias são as *Pseudomonas*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e representantes da família *Enterobacteriaceae* (SILVA et al., 2008). Destes, o gênero *Bacillus* em particular por apresentar uma multiplicidade de compostos antagônicos e por formar endósporo. Facilitando dessa forma a sua manutenção e sobrevivência em diversos nichos (LANNA FILHO & FERRO, 2010).

### **2.3 Streptomyces**

*Streptomyces* é um gênero de bactérias pertencente ao filo de Actinobactéria, são gram-positivas, possui um alto conteúdo G+C e possui mais de 500 espécies de *Streptomyces* descritas, são formadoras de micélio vegetativas e aéreas são encontradas predominantemente no solo e em ambientes aquáticos. No solo, essas bactérias atuam com os fungos na degradação de matéria morta e ajudando na fixação de nitrogênio para crescimento das plantas (VIAENE et al., 2016).

Esse gênero é conhecido pela variedade de metabólitos secundário produzidos, sendo este um dos maiores contribuinte para a farmacologia com cerca de 70% dos antibióticos naturais (por exemplo, neomicina, cifemicina, grisemicina, bottromicinas e estreptomicina), (HODGSON et al., 2000; SCHNIETE et al. 2018).

Em 2002 Bentley, et al., publicou o genoma completo da "S. coelicolor cepa A3 (2)" o cromossomo presente na bactéria continha 8.667.507 pb de comprimento com um conteúdo de GC de 72,1% e que 7.825 genes que codificam proteínas. Foi apresentado que genomas de *Streptomyces* formam cromossomos com uma

estrutura linear, diferentemente da maioria dos genomas bacterianos, que existem na forma de cromossomos circulares.

## **2.4 *Bacillus***

*Bacillus* é um gênero pertencente à família *Bacillaceae* do filo Firmicutes, são bactérias gram-positivas que possuem forma de bastonetes, podem ser aeróbios obrigatórios ou anaeróbios facultativos. Existe cerca de 300 espécies descritas e muitos complexos de espécies ainda não resolvidos (GORDON et al., 1973; SLEPECKY et al., 2006)

Esse Gênero é bem conhecido devido a formação de endosporo representando um estado não reprodutivo dessecado. Devido a essas características estão presentes maioria das vezes em ambientes extremófilos com alta temperatura, radiação ou outras condições abióticas extremas. Eles podem persistir nessas formas inativas por muito tempo e são resistentes as degradações do ambiente (PRIEST et al., 1973).

Outra característica muito importante são as espécies associadas as plantas, exemplo de *B. Subilis* é uma espécie muito estudada por ser um organismo modelo, ela ajuda na fixação de nitrogênio em raízes de plantas além de secretar metabolitos secundários capazes de inibir ou estagnar o crescimento de fitopatógenos. Nesse gênero temos também espécies patogênicas para humanos, como a *B. anthracis* agente causal da antracose, sendo considerada uma arma biológica e *B. cereus* que causa infecções alimentares (KUNST et al., 1997; EARL et al., 2008; HUGH-JONES et al., 2009; BOTTONE, 2010).

## **3. OBJETIVOS**

Geral:

- Realizar a identificação e caracterização de bactérias com potencial para controle de fitopatógenos de interesse agrícola.

Específicos:

- Identificar com base em características moleculares e morfológicas linhagens que possuam atividade contra fitopatógenos;

- Avaliar de maneira qualitativa e quantitativa o potencial de inibição dos micro-organismos antagônicos isolados frente à *Colletotrichum siamense*, *Pseudopestalotiopsis gilvanis* nov. esp., *Neopestalotiopsis formicarum* e *Fusarium decemcellulare*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reativação dos Fitopatógenos

Entre os fitopatógenos isolados de plantas de interesse agrônômico disponíveis no laboratório de biologia molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, encontram-se linhagens de fungos como *Colletotrichum siamense* (agente causal da antracnose em pimenteira); *Pseudopestalotiopsis gilvanis* nov specie e *Neopestalotiopsis formicarum* agentes causais de manchas foliares conhecidas como manchas de pestalotiopsis e *Fusarium decemcellulare* agente etiológico do superbrotamento em guaranazeiro. Os isolados foram preservados em meio BD + Glicerol 50% a -80°C e foram reativados em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) para teste de inibição direta.

### 4.2 Bactérias selecionadas

Foram selecionadas três bactérias isoladas em trabalhos anteriores, executados no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental. Essas bactérias inibiram fungos endofíticos presentes na placa e, por esse potencial antagônico, foram selecionadas para este estudo.

O sedimento foi coletado do Rio Madeira, utilizando uma draga do tipo *petit ponar* (FILIZOLA et al., 2006). As coletas foram realizadas em parceria com o INMETRO, por meio da Unidade Básica Fluvial de Fiscalização e Pesquisa (UBFFP). As amostras foram mantidas em Tubos Falcon e sacos plásticos esterilizados, conservadas em ambiente refrigerado e enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na rodovia AM-010, Km 29, estrada Manaus - Itacoatiara-Amazonas, onde foram realizados o isolamento e os testes.

Aproximadamente 1 grama de amostra do sedimento foi diluído em 10 mL de água ultrapura. A mistura foi submetida à diluições seriadas, em seguida foram plaqueados 50 µL da diluição  $10^{-1}$ . Foram utilizados três meios de culturas distintos: Actinomycetes Isolation Agar - AIA (2 g de caseinato de sódio; 0,100 g de L-asparagina; 4 g de propionato de sódio; 0,500 g de fosfato dipotássico; 0,100 g de sulfato de magnésio; 0,001 g de sulfato ferroso; 15 g de ágar; 1.000 mL de água destilada; 5 mL de glicerol e pH  $8.1 \pm 2$ ) (KUSTER & WILLIAMS, 1964); caseinato-dextrose-ágar ACA (10 g de amido solúvel; 0,3 g de caseína bovina; 2 g de nitrato de potássio; 0,05 de Sulfato de magnésio; 2g de fosfato de potássio dibásico; 2g de Cloreto de Sódio; 0,02 de Carbonato de cálcio; 0,01 de Sulfato ferroso; 15 g de ágar; 1.000 mL de água destilada e pH aproximado de 6,1) eficiente para a seleção de *Streptomyces* (KUSTER & WILLIAMS, 1964); Batata dextrose ágar – BDA (200g de batata; 20g de dextrose; 15g de ágar; 1.000 mL de água destilada) e ISP2 ( 4g de dextrose; 4g de extrato de levedura; 10g de malte; 1.000mL de água destilada). Os meios foram suplementados com cicloheximida (50 mg/mL), para eliminação de fungos, durante o isolamento. Testes antimicrobianos preliminares foram feitos e 5 bactérias com alto potencial antagonista foram selecionadas.

#### **4.3 Obtenções de culturas puras e extração de DNA total**

Culturas puras foram obtidas por meio da técnica de esgotamento por estrias em meios ISP2, durante 7 dias a 30 °C. Para a extração de DNA, as bactérias foram cultivadas em meio ISP 2 sob agitação de 125 rpm a 30 °C por 7 dias. O DNA total foi obtido utilizando o detergente catiônico CTAB 2%, adaptado de DOYLE & DOYLE (1990), a quantificação foi feita via Nanodrop e a integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose 0,8%.

#### **4.4 Identificações moleculares e análises filogenéticas**

Os primers actino A e actino H foram utilizados para amplificação da região 16S com 1529 pb (V1 até v8) e para identificação molecular dos isolados. As reações de PCR foram realizadas utilizando 50 ng do DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X de tampão de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet

P40); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 mM de dNTPs e uma unidade de Taq DNA Polimerase (DNA Express) para um volume final de 25 µL. As condições de PCR para todas as regiões foram: desnaturação inicial de 94°C/3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C/1 min, anelamento a 63°C, extensão de 72°C/1:30 min e extensão final a 72°C/5 min (Referência?).

Os amplicons foram visualizados por meio de eletroforese, utilizando um gel de 1,5%. Os produtos de PCR foram tratados com Polietilenoglicol (PEG 20%) e sequenciadas usando o kit BigDye™ Terminator v3.1, no 3500 GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems™) conforme recomendações do fabricante. A sequência consenso para cada locus foi obtida com base no sequenciamento das fitas F e R utilizando o programa DNA baserassembly (<http://www.dnabaser.com/>).

As sequências para cada locus foram obtidas através da ferramenta PopSet (<http://www.Ncbi.nlm.nih>) e individualmente alinhadas com MUSCLE, utilizando o programa MEGA 7 (TAMURA et al., 2013). Análises filogenéticas foram baseadas em Inferência Bayesiana (BI), Maximum Likelihood (ML) e Maximum parsimony (MP) para um alinhamento com o locus 16S. O tratamento de gaps e missing data para as análises de ML e MP foi feito por meio de partial deletion com cut off de 95%, bootstrap não paramétrico foi feito com 1000 replicatas e as árvores filogenéticas foram geradas e visualizadas com o programa MEGA 7. A inferência bayesiana foi baseada através do modelo testado com Mrmodeltest2 v2 (NYLANDER et al., 2004) através de um alinhamento incluindo todos os sites. A árvore foi obtida por meio da ferramenta MrBayes v. 3.6 usando a plataforma CIPRES (<https://www.phylo.org/>), Probabilidade a posteriori (PP) bem como a topologia da árvore foi gerada com Figtree v. 1.1.2 (RAMBAUT et al., 2009).

#### **4.5 Teste de inibição direta**

Os isolados foram testados *in vitro* para potencial atividade antagônica contra *F. decemcellulare*, *C. siamense*, *P. gilvanis* nov. esp., e *N. formicarum* usando o método de oposição direta (DENIS & WEBISTER, 1971). O micélio dos isolados antagônicos foi inoculado nas margens da placa, contendo o meio BDA; o patógeno foi inoculado no centro da placa com distância de 3 cm dos antagônicos o teste foi



realizado em triplicata e as placas foram incubadas a 25 °C. O tratamento controle foi feito usando as linhagens de fungos fitopatogênicos individualmente em placas e as avaliações foram feitas mensurando e anotando a porcentagem de inibição de crescimento por cinco, sete, dez e quinze dias.

A porcentagem de inibição foi calculada através da equação  $IR (\%) = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100$  onde: IR é a Taxa Inibitória (%), Dc é o Diâmetro de controle negativo (cm); Dt é o diâmetro do tratamento ou controle positivo (cm), conforme descrito por (CAMPANILE, et al., 2007).

#### **4.6 Caracterização morfológica e Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia da colônia foi feita através da visualização na lupa, considerando os seguintes aspectos da colônia: tamanho; forma; elevação; bordas; estrutura; brilho; cor e aspecto. A presença de flagelos, forma e arranjo das células e presença de esporos foram verificadas por meio de microscopia eletrônica de varredura.

Para microscopia eletrônica de varredura, as bactérias foram isoladas em meio de cultura ISP2. Pequenos fragmentos, de aproximadamente 1 cm do meio contendo as colônias foram recortados das placas. Estes fragmentos foram imersos em solução fixadora por 24 horas posteriormente foram submetidos à desidratação em série crescente de álcool (60%, 70%, 80%, 90% e 100%), secagem em ponto crítico e metalização em ouro. As imagens foram feitas no microscópio eletrônico de varredura, modelo TESCAN-VEGAN 3 (SOUZA et al., 1998).

#### **4.7 Teste de amilase**

O teste de amilase foi conduzido em placas de Petri, contendo meio seletivo (5 g de NaCl; 5 g de pepitona; 5g de extrato de carne; 10 g de glicose; 20 g de ágar; 1000 mL de água destilada, pH ajustado para 6.0) e inóculo das bactérias. As placas foram incubadas por 3 dias, à 27°C. Após esse período, os halos de degradação foram revelados com lugol (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

#### 4.8 Teste de lipase

O teste de lipase foi conduzido em placas de Petri, contendo meio seletivo (10 g de peptona; 5 g de NaCl; 0.1g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 20g de ágar; 1000 mL de água destilada; pH ajustado para 6.0) (WANG et al., 2015), posteriormente foram adicionados Tween-20 e inoculo das bactérias. As placas foram incubadas por 3 dias, à 27 °C. Após esse período, os halos de degradação foram medidos. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As três bactérias isoladas das amostras provenientes da raiz do guaranazeiro, foram selecionadas por apresentar atividades antagônicas contra fungos endofíticos e patogênicos (Figura 1- A, B, C e D). Já das amostras de sedimentos do rio madeira após o screening foram selecionadas cinco bactérias com potencial antimicrobiano (Figura 2 A e B).

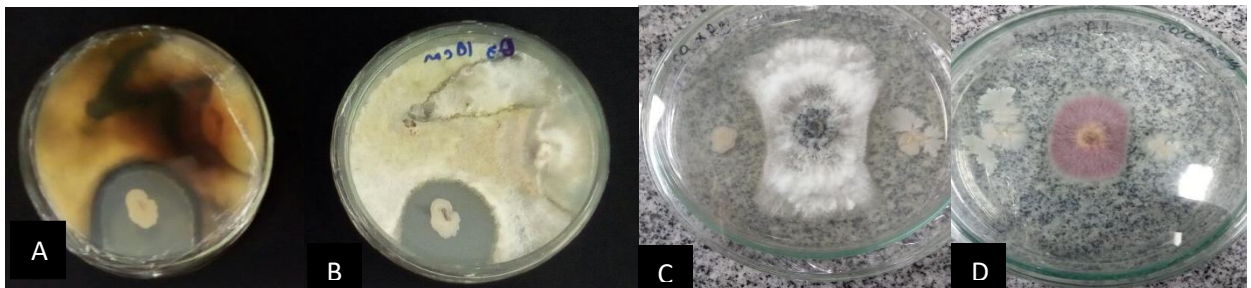


Fig 1: Isolados do gênero *Bacillus* sp. A e B: placas de meio BDA contendo fragmentos de raiz do guaranazeiro revelam bactérias com potencial antagonista para fungos endofíticos. C e D: testes preliminares mostram atividade contra fitopatógenos de interesse agrícola.

#### 5.1- Identificação molecular e caracterização morfológica dos isolados

Com base no sequenciamento da região 16S os isolados testados foram separados em dois gêneros: *Bacillus* (PcA1, PcA2, PcA3 e MAD207) e *Streptomyces* (MAD24, MAD42, MAD 51 e MAD189). Inferências filogenéticas para cada gênero foram realizadas e os resultados indicam que os isolados PcA1, PcA2, PcA3 e MAD207 estão filogeneticamente mais relacionados com espécies do complexo *Bacillus subtilis* (Figura 2). Os dados baseados na região 16S são normalmente insuficientes para resolver complexos que estão intimamente relacionados como o de *B. subtilis*, devido a elevada conservação e conseqüentemente baixa resolução

filogenéticas. A resolução filogenéticas destes complexos são realizadas por meio de análise multilocus onde análise concatenada de diferentes genes e do 16S rDNA são utilizados separar as espécies (Ash et al., 1991; ROONEY et al., 2009).

Dentro do grupo da *B. subtilis* o isolado PcA1, PcA3 e MAD207 está filogeneticamente relacionado com *B. velezensis*, anteriormente descrita como uma variedade de *B. Amyloliquenfaciens*. Contudo, RUIZ-GARCIA et al., (2005) relata que estirpes de *B. velezensis* se tratava de uma nova espécie com potenciais para produção de surfactantes e antimicrobianos. Já o isolado PcA2 está mais próximo da espécie de *B. subtilis* uma espécie conhecida por estar presente nas raízes das plantas ajudando na fixação de nitrogênio, induz as plantas ao crescimento e produz antimicrobiano que diminui o ataque do fitopatógeno.

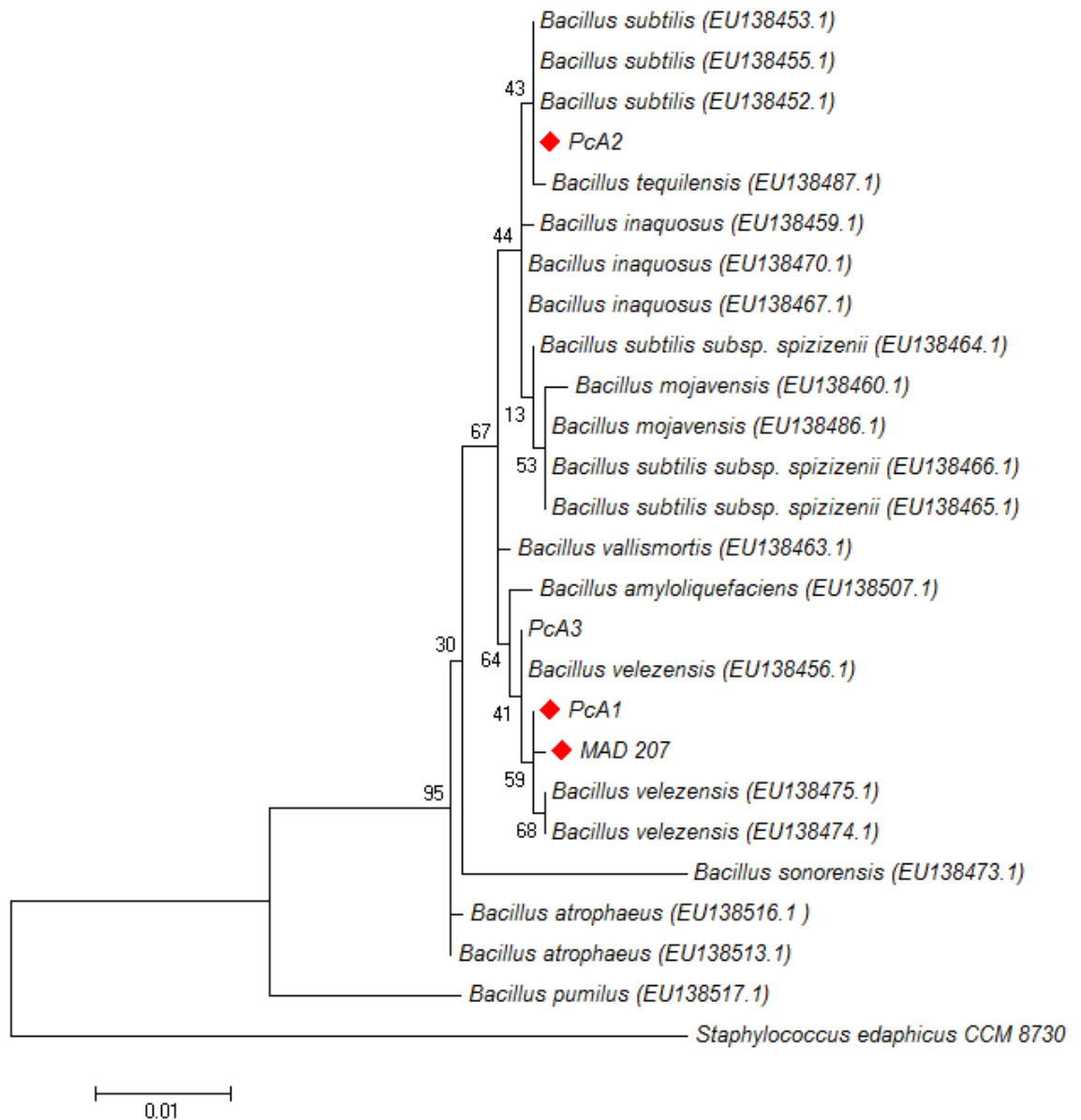


Fig. 2: Inferência filogenética com base no método Máxima verossimilhança (ML- maximum-likelihood) com ramificação de 1000 bootstrap. Mostrando a relação filogenética entre vinte e seis isolados do gênero *Bacillus* com um grupo externo do Gênero *Staphylococcus*.

A inferência filogenéticas dos isolados MAD24, MAD42, MAD51, MAD189 indicou que MAD 24 é o único que está mais proximidade relacionado a espécies já reportadas e foi agrupado em um clado politômico com várias espécies entre elas *S. costaricanus*, uma espécie relatada por ESNARD & POTTER (1995) isolada de solo tropical, com potenciais contra fungos e nematoides.

Os isolados MAD189 e MAD42 estão filogeneticamente os mais próximos entre si e formaram um grupo separado das demais espécies. O isolado MAD51 não mostrou clara relação filogenética com as demais espécies utilizadas nesta análise, sendo alocado como membro mais externo do clado que apresenta espécies como: *S. pulveraceus*, *S. ciscaucasicus* e *S. sanglieri*, estas utilizadas na biotecnologia como produtor de proteases (JAYASREE et al., 2012), degradando metais pesados (LI et al., 2010) e atividade antagonista (AZURA et. Al, 2016).

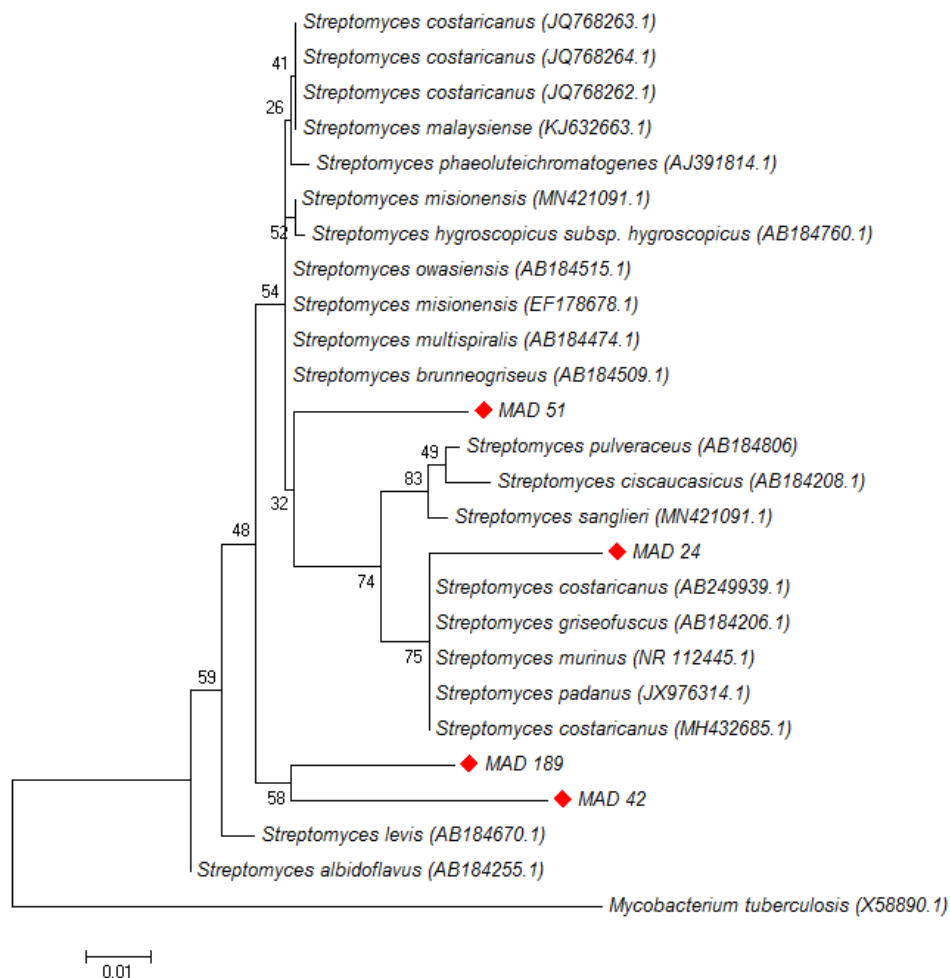


Fig. 3: Inferência filogenética com base no método Máxima verossimilhança (ML- maximum-likelihood) com ramificação de 1000 bootstrap. Mostrando a relação filogenética entre vinte e seis isolados do gênero *Bacillus* com um grupo externo do Gênero *Staphylococcus*.

Os dados morfológicos corroboram com as inferências moleculares, análises preliminares de MEV indicam que cada um dos 8 isolados apresentam tamanho e morfologia diferentes, reforçando a hipótese que estes pertencem a diferentes espécies.

Tabela 1: Morfologia da colônia dos isolados do gênero *Bacillus*.

Morfologia	Tamanho	Forma	Elevação	Borda	Estrutura	Brilho	Cor	Aspecto
PcA1	Médio	Irregular	Protuberante	Lobada	Lisa	Opaca	Esbranquiçada	Gelatinosa
PcA2	Médio	Lisa	Achatada	Onduladas	Lisa	Translúcida	Transparente	Leitosa
PcA3	Médio	Lisa	Elevada	Lobadas	Granulosa	Opaca	Beje	Leitosa
MAD207	Médio	Lisa	Ondulada	Lobada	Lisa	Opaca	Beje	Leitosa

Legenda: Tamanho (pequena  $\leq 2$  cm; média 2 a 5 cm; grande  $\geq 5$  cm)

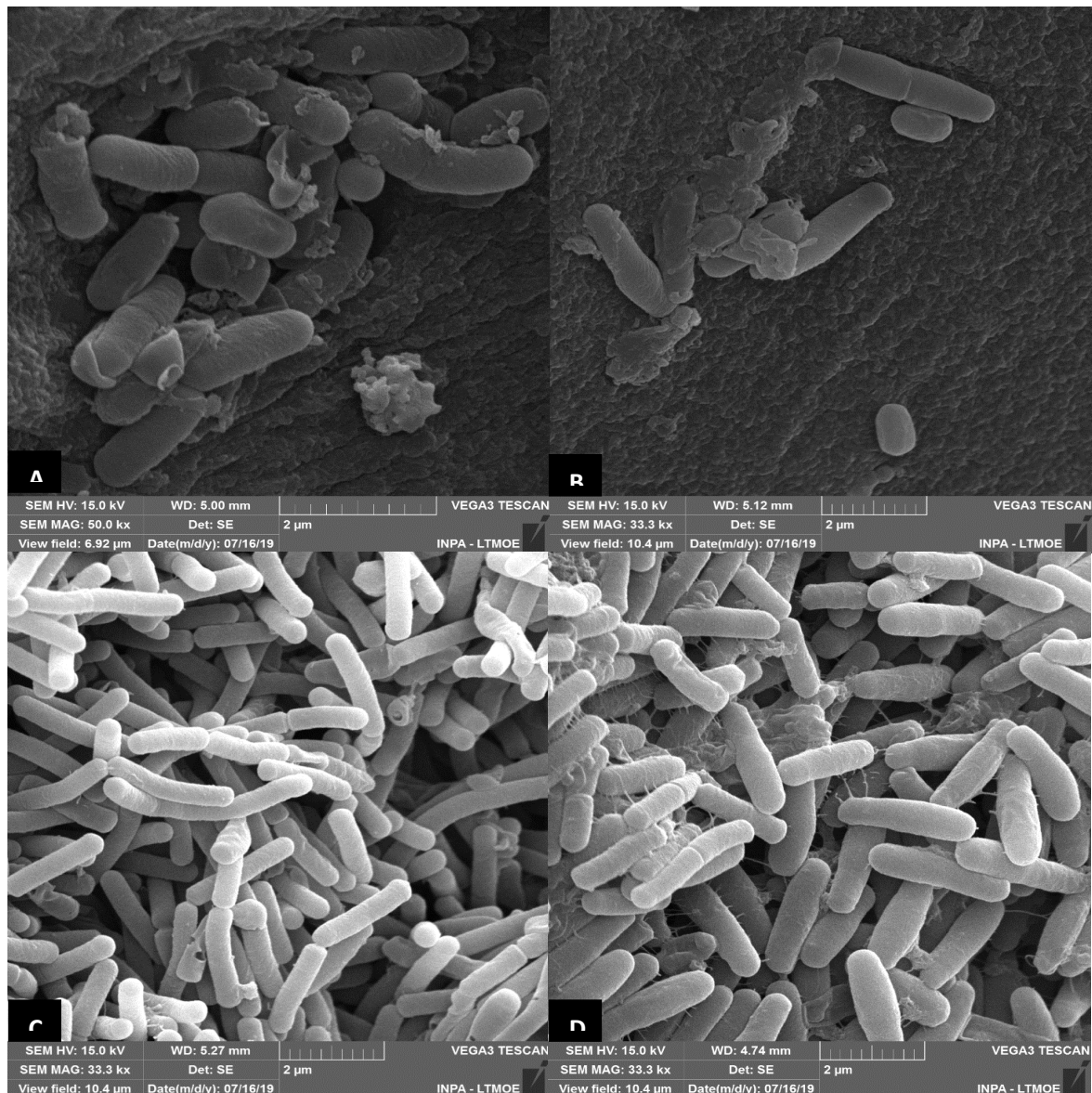


Fig. 4: fotomicrografia dos Isolados PcA1 (A), PcA2 (B), PcA3 (C) e MAD207(D) crescidos em dois meios de culturas LB para análise da morfologia celular e da colônia.

Os dados de MEV e aspectos da colônia permitiram identificar diferenças na morfológica da colônia micro e macroscopicamente. Não foram visualizados flagelos, o formato das células se diferencia no tamanho e no comprimento dos quatro isolados (Tabela 1) e microscopia eletrônica (Figura 4).

Tabela 2: Morfologia da colônia dos isolados do gênero *Streptomyces*.

	Meio de cultura	crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo	Pigmento
MAD24	ACA	Pouco	Marrom	-	-
	AIA	Pouco	-	Esbranquiçada	Amarelo
	ISP2	Bom	Marrom	Branca	Amarelo
	BDA	Bom	Marrom	Branca	Amarelo
MAD42	ACA	Pouco	Branca	-	-
	AIA	Pouco	-	Esbranquiçada	-
	ISP2	Bom	Branca	Branca	-
	BDA	Bom	Branca	Branca	-
MAD51	ACA	Pouco	Marrom	-	-
	AIA	Pouco	-	Esbranquiçada	-
	ISP2	Bom	Branca	Branca	Marrom claro
	BDA	Bom	Branca	Amarelo claro	Marrom claro
MAD189	ACA	Pouco	-	Esbranquiçada	-
	AIA	Pouco	-	Esbranquiçada	-
	ISP2	Bom	Branca	Branca	Marrom claro
	BDA	Bom	Cinza	Branca	Marrom Claro

Legenda: - não apresentou;

A morfologia da colônia (Tabela 2) do gênero *Streptomyces* junto com a eletromicrografia (Figura 5) foi possível observar a diferença da morfologia entre as espécies, a produção de esporos e produção de pigmentos em diferentes meios de cultura. Com a microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a diferença nas hifas e na formação da cadeia de esporos de cada isolado.

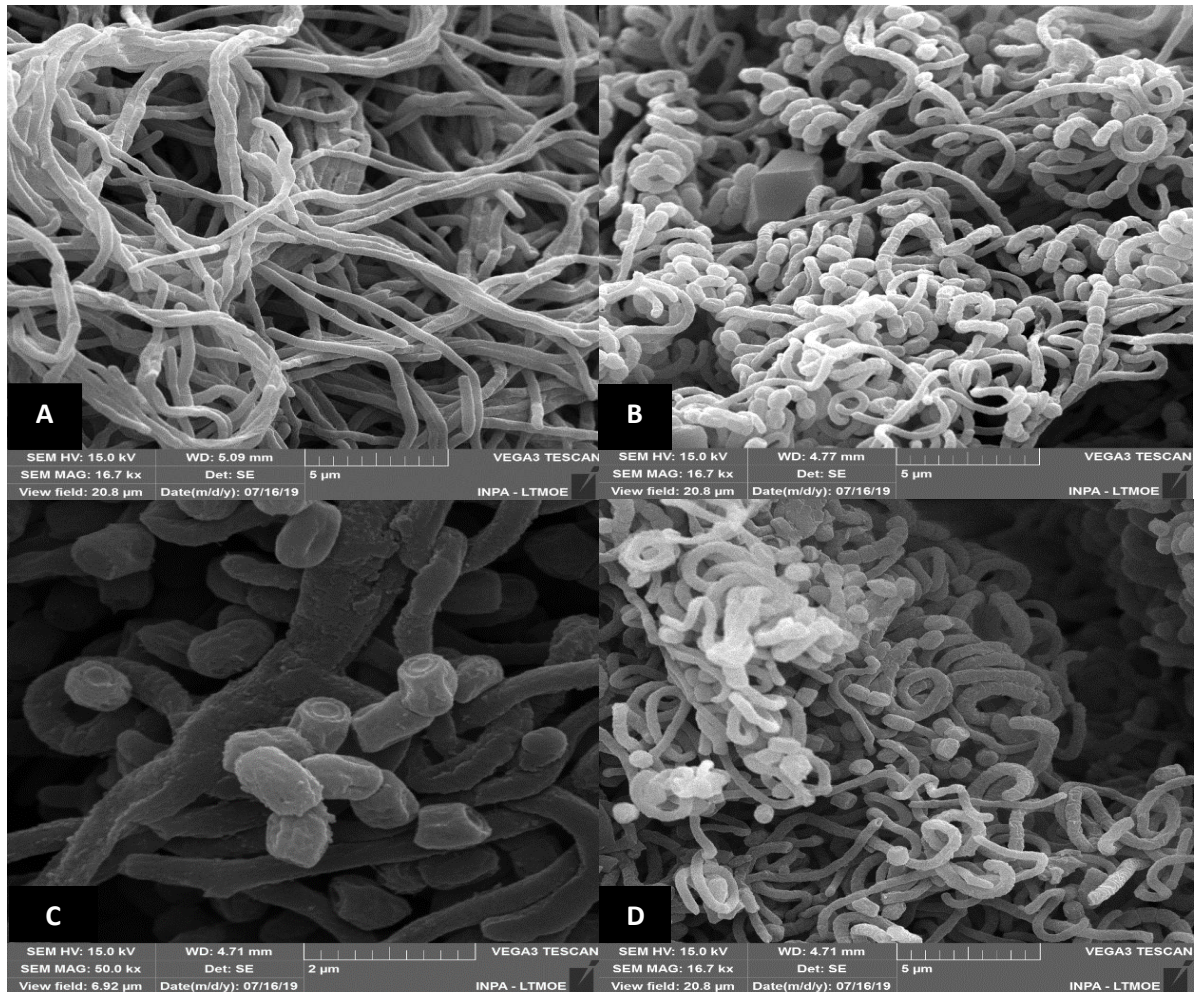


Fig. 5: fotomicrográfrica dos Isolados MAD 189 (A), MAD 51 (B), MAD 42 (C) e MAD 24(D) crescidos em dois meios de culturas ISP2 para análise da morfologia celular e da colônia.

## 5.2 Potencial inibitórios de isolados do gênero *Bacillus*

Os isolados apresentaram potencial de inibição contra os quatro fitopatógenos testados e a maior inibição contra o fitopatógeno *F. decemcellulare*, agente causal do superbrotamento em guaranazeiro (LOBO et al., 2016). Earl et al., (2008) relatam que *Bacillus subtilis* é um complexo de espécies que são associadas a raízes de plantas. Devido à formação de endósporo (estrutura de resistência) ela facilmente se



dissemina pelo solo. Essa associação faz com que haja um maior crescimento das plantas, pois as bactérias inibem o crescimento de fitopatógenos presentes nas plantas, suas enzimas secretadas ativam o sistema de defesa e hormônios de crescimento da planta, além de disponibilizar nutrientes necessários para as plantas (nitrogênio, fosforo), (CARZOLA et al., 2007; NARGORSKA et al., 2007).

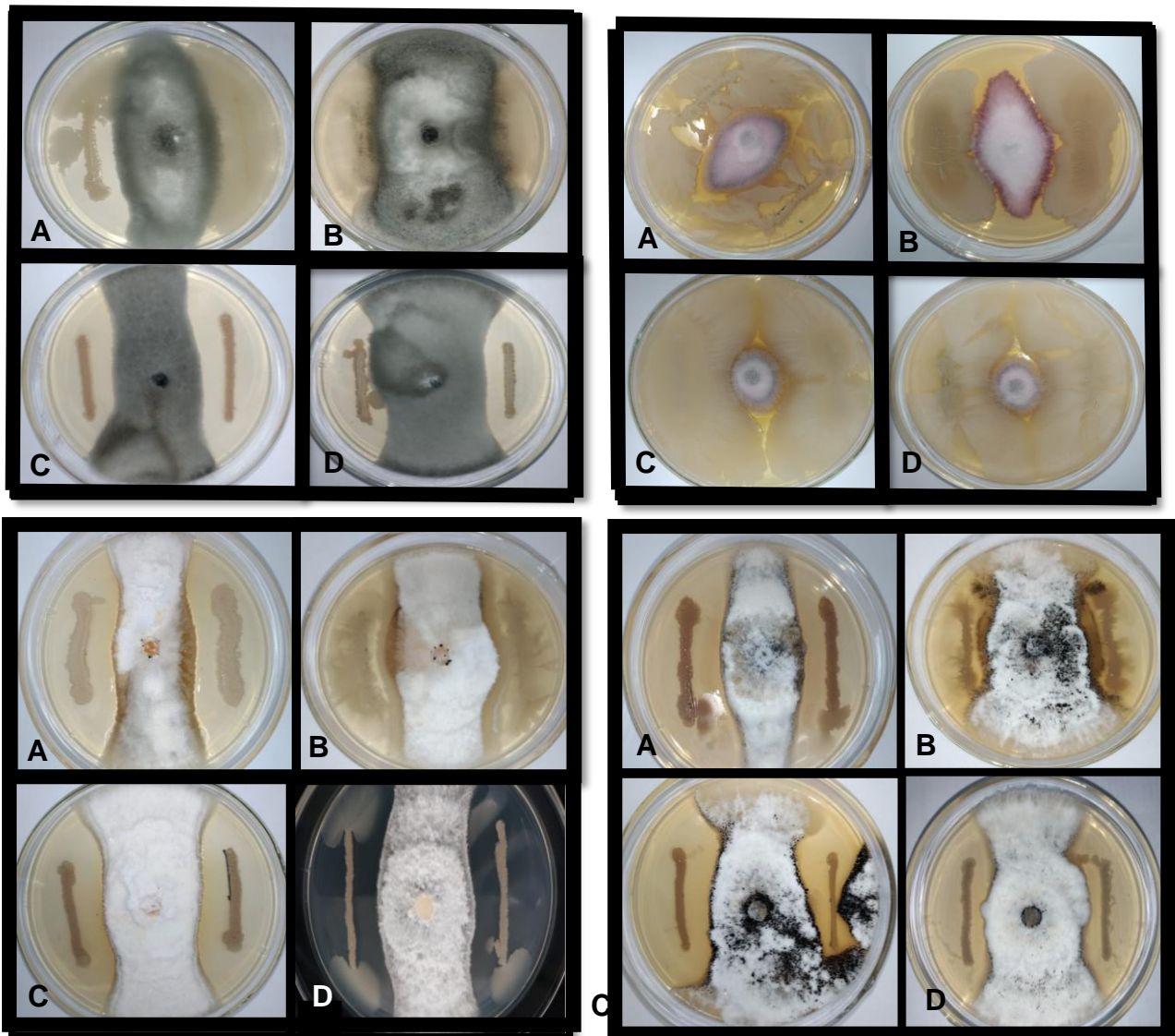


Fig. 6: Teste de inibição dos isolados PcA1 (A), PcA2 (B), PcA3 (C), MAD 207 (D), frente ao fitopatógenos *C. siamenses*; *F. decemcellulare*; *N. formicacum* e *P. gilvanis*.

A porcentagem de inibição dos isolados foi mais eficiente contra o *F. decemcellulare*, o PcA1 e MAD207 apresentou a melhor inibição ao 10º dia e de 72% e 78% respectivamente, e o PcA2 e PcA3 apresentaram ao 15º dia com 76% e 74%. O fitopatógeno *C. siamense* foi menos inibido por PcA1 e PcA2 com o melhor potencial ao 10º dia com 65% e 56% respectivamente. O *P. gilvanis* foi menos inibido pelo

isolado PcA3 com o melhor potencial (61%) no 10 dia e o *N. formicarum* pelo MAD207 no 10º dia com 58% (Figura 6 e 7). Nos testes bioquímicos de degradação de amilase e lipase, os isolados apresentaram um halo de degradação com IE menor que 2 indicando que estes não são bons produtores destas enzimas.

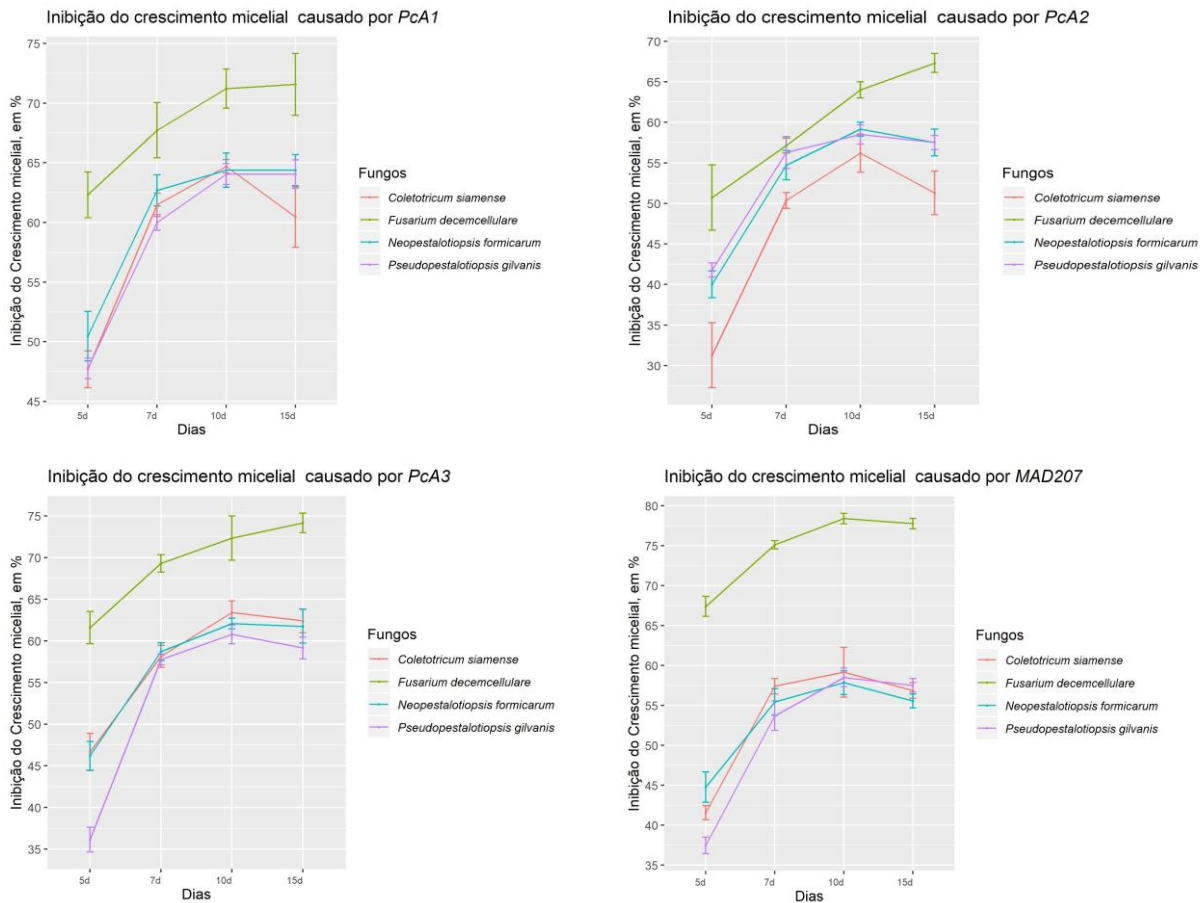


Fig. 7: Teste de inibição dos isolados PcA1 , PcA2, PcA3, MAD 207, frente ao fitopatógenos *C. siamenses*; *F. decemcellulare*; *N. forminacum* e *P. gilvanis*.

### 5.3 Potencial inibitório de isolados do gênero *Streptomyces*

O teste de inibição mostrou que os isolados possuem atividade antagônica contra todos os fitopatógenos testados (com exceção do MAD42 contra o *F. decemcellulare*). Os isolados MAD51 e MAD42 inibiram melhor o fitopatógeno *C. siamense* apresentando a melhor inibição no 10º dia com 74% e 72% respectivamente, contra o *N. formicarum* no 10º dia o isolado MAD189 apresentou 69% e o MAD 24 no 15º com 74% de inibição. Todos os isolados apresentaram menor inibição contra o *F. decemcellulare* também com o melhor rendimento no 10º dia, a linhagem MAD42 não cresceu com o *F. decemcellulare* então não foi possível realizar

a análise deste isolado (Figura 8 e 9). Nos testes bioquímicos de degradação de amilase e lipase, os isolados apresentaram um halo de degradação com IE menor que 2 indicando que estes não são bons produtores destas enzimas.

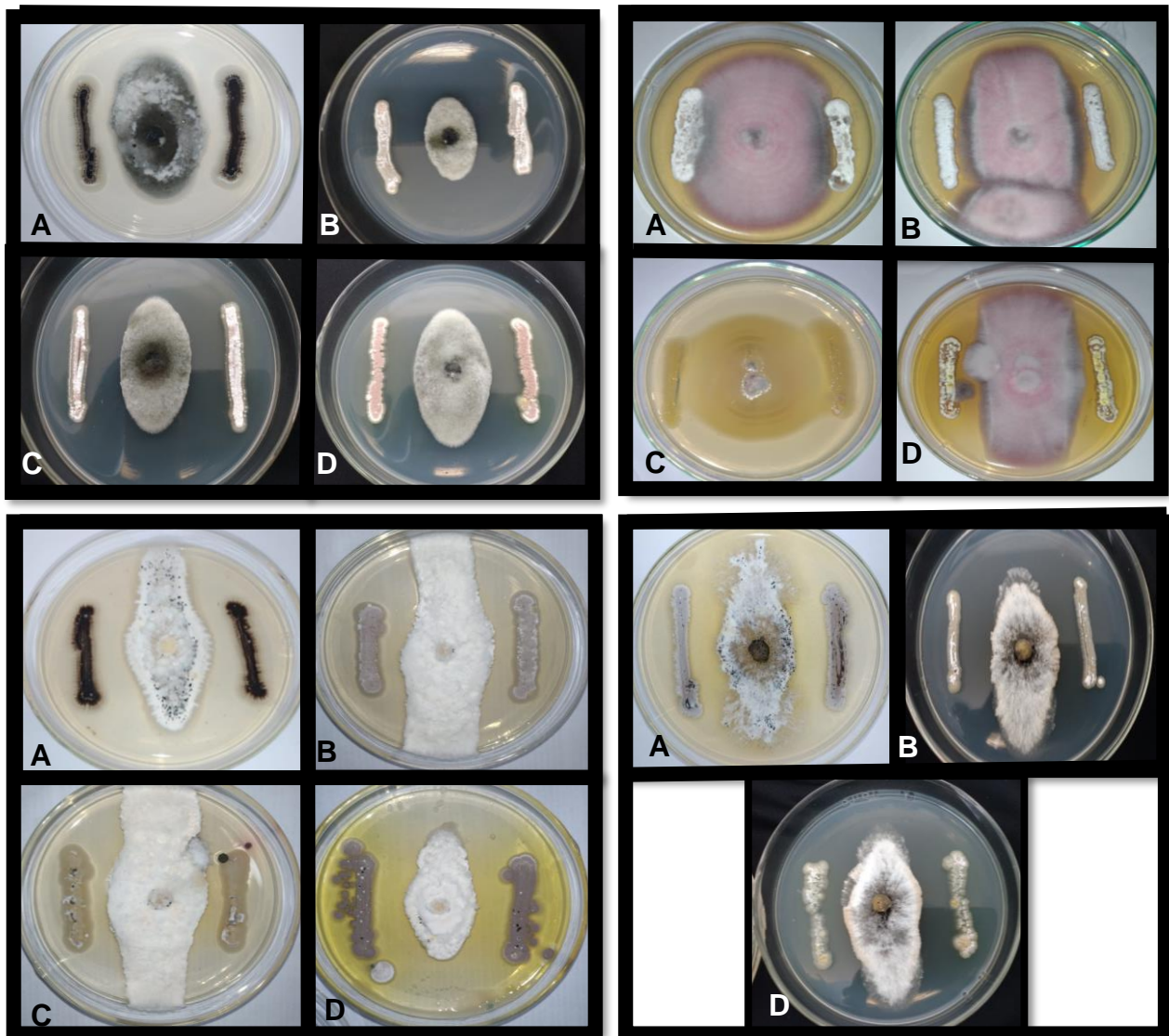


Fig. 8: Teste de inibição dos isolados MAD189(A), MAD51(B), MAD42 (C), MAD24 (D), frente ao fitopatógenos *C. siamenses*; *F. decemcellulare*; *N. forminacum* e *P. gilvanis*.

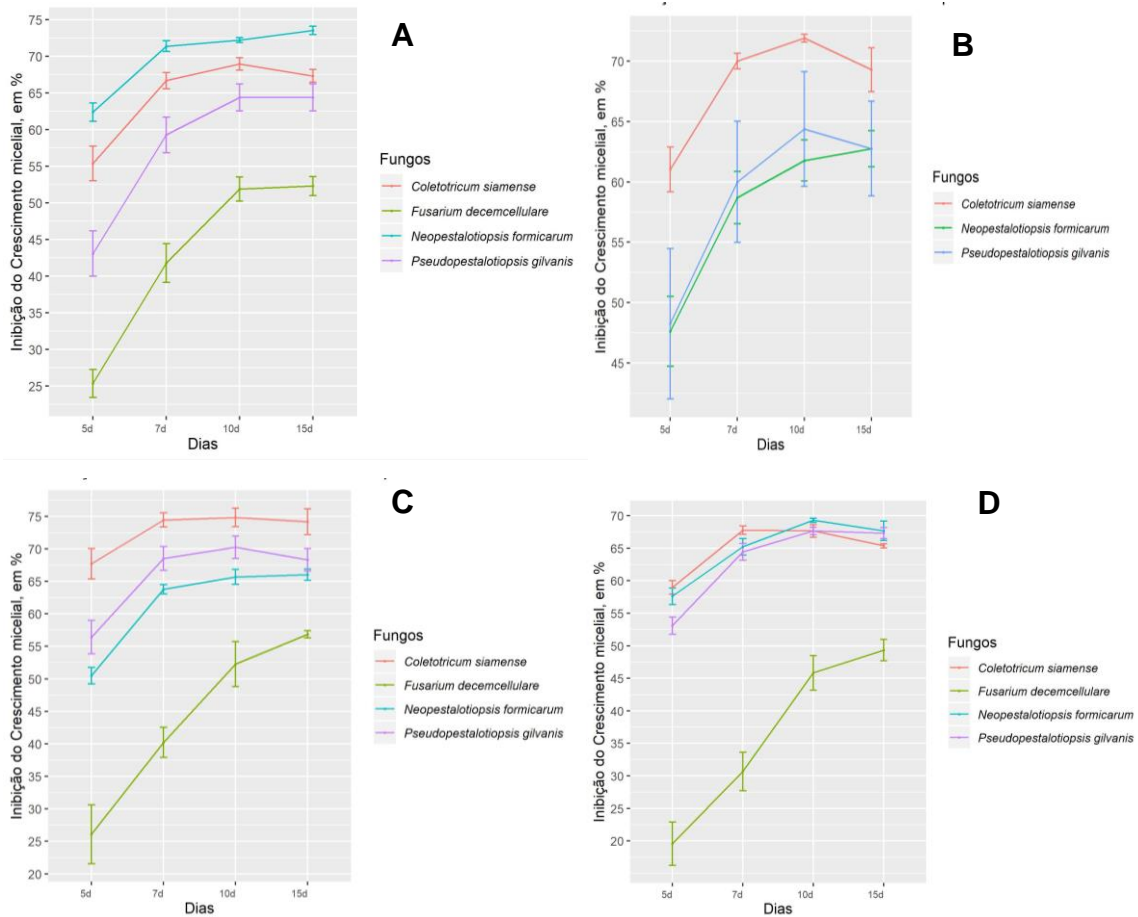


Fig. 9: Teste de inibição dos isolados MAD24(A), MAD42(B), MAD51 (C), MAD189(D), frente ao fitopatógenos *C. siamenses*; *F. decemcellulare*; *N. formicarium* e *P. gilvanis*.

## 6. CONCLUSÕES

As análises macro e microscópica mostraram que as espécies possuem características diferentes. Isolados (PcA1, PcA2, PcA3 e MAD 207) foram identificados molecular e morfológicamente como pertencente ao gênero *Bacillus*. Os isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces* (MAD24, MAD42, MAD51 e MAD189) mostraram a morfologia das colônias e pigmentação diferentes, com hifas e formação da cadeia de esporos em algumas dessas amostras.

Todos os isolados apresentaram inibição contra os fitopatógenos de quatro gêneros diferentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMY, Amilcar. Dinâmica Fluvial do Rio Madeira. 2016

AZURA, AB Nur et al. Streptomyces sanglieri which colonised and enhanced the growth of Elaeis guineensis Jacq. seedlings was antagonistic to Ganoderma boninense in in vitro studies. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 485-493, 2016.

BARDIN, Marc et al. 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.

BARROS, Fernanda Carvalho et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.

BOTTONE, Edward J. Bacillus cereus, a volatile human pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 382-398, 2010.

BOTTONE, Edward J. Bacillus cereus, a volatile human pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 382-398, 2010.

CAMPANILE, Grazia; RUSCELLI, Angela; LUISI, Nicola. Antagonistic activity of endophytic fungi towards Diplodia corticola assessed by in vitro and in planta tests. **European Journal of Plant**, 2007.

CARVALHO, Fernando P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48-60, 2017.

CAZORLA, F.M.et al.(2007) Isolation and characterization of antagonistic Bacillus subtilis strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. **J. Appl. Microbiol.**103, 1950–1959

CELESTINO, Jessyca et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569-575, 2014.

CRESCI, Gail A.; BAWDEN, Emmy. Gut microbiome: what we do and don't know. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, n. 6, p. 734-746, 2015.

CUTTING, Simon M. Bacillus probiotics. **Food microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.

DE ARAÚJO, Gabrielly Beatriz da Silva. FISIOGRAFIA DO RIO MADEIRA: UMA ANÁLISE SOBRE A FORMAÇÃO, ESTRUTURA E PROCESSOS FLUVIAIS. **ARIGÓ-Revista do Grupo PET e Acadêmicos de Geografia da Ufac**, v. 1, n. 01, p. 118-127, 2018.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma: I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British **Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 25-IN3, 1971.

DOYLE, Jeff J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.

EARL, Ashlee M.; LOSICK, Richard; KOLTER, Roberto. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 6, p. 269-275, 2008.

ESNARD, Joseph; POTTER, Thomas L.; ZUCKERMAN, Bert M. *Streptomyces costaricanus* sp. nov., isolated from nematode-suppressive soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 775-779, 1995.

FAN, Ben et al. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an "operational group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 22, 2017.

FERRAZ, Hélio Gledson Maciel et al. Elaboração de um meio semi-seletivo com base na resistência múltipla constitutiva de *Pseudomonas putida* (UFV-0073) a antibióticos. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 4, n. 1, 2010.

FILIZOLA, Heloisa Ferreira. Manual de procedimentos de coleta de amostras em áreas agrícolas para análise da qualidade ambiental: solo, água e sedimentos. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2006.

GEBREYOHANNES, Gebreselema et al. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. **Asian pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 6, p. 426-435, 2013.

GORDON, R. E. et al. The genus bacillus. **US Department of Agriculture handbook**, n. 427, p. 109-26, 1973.

HALFELD-VIEIRA, Bernardo A.; NECHET, Kátia L. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da mancha-de-cercospora em melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 46-50, 2006.

HANKIN, Lester; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HODGSON, David A. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. 2000.

HUGH-JONES, Martin; BLACKBURN, Jason. The ecology of *Bacillus anthracis*. **Molecular aspects of medicine**, v. 30, n. 6, p. 356-367, 2009.

JAYARAJ, Ravindran; MEGHA, Pankajshan; SREEDEV, Puthur. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. **Interdisciplinary toxicology**, v. 9, n. 3-4, p. 90-100, 2016.

JAYASREE, D. et al. Enhancement of alkaline protease production isolated from *Streptomyces pulveraceus* using response surface methodology. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 1-6, 2012.

JOGAIAH, Sudisha et al. Isolation and evaluation of proteolytic actinomycete isolates as novel inducers of pearl millet downy mildew disease protection. **Scientific reports**, v. 6, p. 30789, 2016

JOKANOVIĆ, Milan. Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review. **Toxicology**, v. 410, p. 125-131, 2018.

KIM, Jong-Shik et al. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 684-690, 2007.

KUNST, F. et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, v. 390, n. 6657, p. 249, 1997.

KÜSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, v. 202, n. 4935, p. 928-929, 1964.

LABEDA, David P. Taxonomic evaluation of putative *Streptomyces scabiei* strains held in the ARS Culture Collection (NRRL) using multi-locus sequence analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 109, n. 3, p. 349-356, 2016.

LAM, Kin S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 3, p. 245-251, 2006.

LANNA FILHO, Roberto; FERRO, Henrique Monteiro; DE PINHO, Renata Silva Canuto. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 4, n. 2, 2010.

LI, Huifen et al. Biosorption of Zn (II) by live and dead cells of *Streptomyces ciscaucasicus* strain CCNWHX 72-14. **Journal of hazardous materials**, v. 179, n. 1-3, p. 151-159, 2010.

LOBO, Igor Kelvyn Cavalcante et al. Análise do transcriptoma de *Fusarium decemcellulare* agente causal do superbrotamento em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). 2016.

LUDWIG, Wolfgang; SCHLEIFER, Karl-Heinz; WHITMAN, William B. Revised road map to the phylum Firmicutes. In: **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Springer, New York, NY, 2009. p. 1-13.

MICHEREFF, Sami J. Fundamentos de fitopatologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia–Área de Fitossanidade, Recife–PE, 2001

MOTTA, Amanda S.; CLADERA-OLIVERA, Florencia; BRANDELLI, Adriano. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 307-310, 2004.

MUNIZ, Luciana da Silva et al. Análise dos padrões fluviométricos da Bacia do Rio Madeira-Brasil. 2013.



Nagorska, K. et al. (2007) Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. **Acta Biochim. Pol.** 54, 495–508

NOUROZIAN, Javad et al. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, v. 28, n. Suppl 1, p. 29-38, 2006.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. **Program distributed by the author**, 2004.

PARRA, JOSÉ ROBERTO P. et al. Controle biológico: terminologia. Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo. Manole editora, p. 1-16, 2002.

PRIEST, Fergus G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriological reviews**, v. 41, n. 3, p. 711, 1977.

RAMBAUT, Andrew. FigTree, version 1.3. 1. Computer program distributed by the author, website: <http://treebioedacuk/software/figtree/> [accessed January 4, 2011], 2009.

RÊGO, MCF; ALMEIDA, C. M. Controle biológico. 1998.

ROONEY, Alejandro P. et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 10, p. 2429-2436, 2009.

RUIZ-GARCIA, Cristina et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 191-195, 2005.

SABRA, Farid Soliman; MEHANA, E. S. E. D. Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. **Asian Journal of Agriculture and Food Sciences (ISSN: 2321–1571)**, v. 3, n. 01, 2015.

SANKOH, Alhaji I. et al. An assessment of the impacts of pesticide use on the environment and health of rice farmers in Sierra Leone. **Environment international**, v. 94, p. 458-466, 2016.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 5, p. 158-164, 1996.

SCHNIETE, Jana K. et al. Expanding primary metabolism helps generate the metabolic robustness to facilitate antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. **MBio**, v. 9, n. 1, p. e02283-17, 2018.

SILVA, Célia CG; SILVA, Sofia PM; RIBEIRO, Susana C. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 594, 2018.

SILVA, Juliana Resende Campos et al. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e agrotecnologia*, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008

SLEPECKY, Ralph A.; HEMPHILL, H. Ernest. The genus *Bacillus*—nonmedical. *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, p. 530-562, 2006.

SOUZA, W. (ed). *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*. Rio de Janeiro, **Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica**, 1998

STEIN, Torsten. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TORRES, Duilio; CAPOTE, Tarcicio. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. **Revista Ecosistemas**, v. 13, n. 3, 2004.

TURNBULL, Peter CB; KRAMER, J. M.; MELLING, J. *Bacillus*. **Manual of clinical microbiology**, v. 5, p. 296-303, 1991.

UZMA, Fazilath et al. Endophytic Fungi—Alternative Sources of Cytotoxic Compounds: A Review. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, 2018.

VAN DEN BOSCH, Robert. The cost of poisons. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, v. 14, n. 7, p. 18-31, 1972.

VIAENE, Tom et al. Streptomyces as a plant's best friend. *FEMS microbiology ecology*, v. 92, n. 8, 2016.

WANG, Weiyi et al. Proteomic analysis of murine testes lipid droplets. *Scientific reports*, v. 5, p. 12070, 2015.

WILLERDING, André Luis et al. Lipase activity among bacteria isolated from Amazonian soils. *Enzyme research*, v. 2011, 2011

Wink J.; Mohammadipanah F.; Javad Hamedi; *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*, 2017.

XIANG, Jingyu et al. CXCR4 protein epitope mimetic antagonist POL5551 disrupts metastasis and enhances chemotherapy effect in triple-negative breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*, v. 14, n. 11, p. 2473-2485, 2015.

YUAN, Yuan et al. Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against verticillium wilt disease. *PloS one*, v. 12, n. 1, p. e0170557, 2017.