

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO
TRÓPICO ÚMIDO – PPG/ATU**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESPÉCIES DOS GÊNEROS
Streptomyces E *Bacillus* ISOLADOS DOS RIOS MADEIRA E PURUS
PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA**

INGRIDE JARLINE SANTOS DA SILVA

**Manaus, Amazonas
Junho, 2021**

INGRIDE JARLINE SANTOS DA SILVA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESPÉCIES DOS GÊNEROS
Streptomyces E *Bacillus* ISOLADOS DOS RIOS MADEIRA E PURUS
PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA**

Orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva

Coorientador: Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em Agricultura no Trópico Úmido.

**Manaus, Amazonas
Junho, 2021**

Folha de Aprovação

Banca Julgadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TÍTULO: "POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
Streptomyces spp. E Bacillus spp. ISOLADOS DOS RIOS
MADEIRA E PURUS PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA"**

AUTOR (A):

Ingride Jarline Santos da Silva

BANCA JULGADORA:



Dra. Marisa Vieira de Queiroz (UFV)
(Membro)



Dr. Marcos Antônio Soares (UFMT)
(Membro)



Dra. Aricléia de Moraes Catarino (INPA)
(Membro)

©SEDAB/INPA - Ficha Catalográfica Automática gerada com dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecário responsável: Jorge Luiz Cativo Alauzo - CRB11/908

S586p SANTOS DA SILVA, Ingride Jarline
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESPÉCIES DOS GÊNEROS
Streptomyces E Bacillus ISOLADOS DOS RIOS MADEIRA E
PURUS PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA / Ingride Jarline
SANTOS DA SILVA; orientador Gilvan Ferreira da
Silva Silva; coorientador Rudi Emerson de Lima
Procópio Procópio . -- Manaus:[s.l], 2021.
75 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação
em Agricultura do Trópico Úmido) -- Coordenação do
Programa de Pós-Graduação, INPA, 2021.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Bioproduto. 3.
Fitopatígeno. I. Silva, Gilvan Ferreira da Silva,
orient. II. Procópio , Rudi Emerson de Lima Procópio
, coorient. III. Título.

CDD: 630

Dedicatória

À minha mãe, Ednir Carvalho dos Santos, por todo auxílio e incentivo para continuar seguindo na vida acadêmica e realização de meus sonhos.

Agradecimentos

À minha família por todo apoio, incentivo e compreensão durante essa trajetória, em especial minha mãe (Ednir Carvalho) e padrasto (Domingos Sávio) pelas palavras positivas nos momentos mais delicados durante esse período.

A todos os meus amigos por compreender minha ausência durante alguns/muitos momentos, eu realmente estava estudando.

À Thayná Marães, amiga que fiz dentro do laboratório e que tanto me ajudou durante esse período. Sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

À minha amiga Vanessa Ribeiro e sua mãe pelo amparo nesse processo de finalização acadêmica, serei eternamente grata.

Aos técnicos de laboratório, Karina Bichara e Jeferson Cruz por todo auxílio e troca de conhecimento, aprendi demais com vocês.

Ao Dr. Gilvan Ferreira da Silva, pela orientação, paciência e troca de conhecimento durante esse período.

Ao Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio, por toda orientação e incentivo durante o processo acadêmico.

À Embrapa Amazônia Ocidental, em especial ao laboratório de Biologia Molecular pelo suporte estrutural necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA/ESA e ESAT) e Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), pela colaboração durante do desenvolvimento deste trabalho

Ao Programa de Pós-graduação em Agricultura no Trópico Úmido/PPG-ATU-INPA pela oportunidade.

À FAPEAM, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto.

Meus sinceros agradecimentos.

Sou a primeira mulher da minha linhagem a ter liberdade de escolha. A construir o futuro como bem entender. Dizer o que vier à minha mente quando quiser, sem ouvir o barulho do chicote. São centenas de primeiras vezes pelas quais sou grata, cenas que minha mãe e a mãe dela não tiveram o privilégio de viver. É uma verdadeira honra ser a primeira mulher da família que pode sentir os seus próprios desejos. Não é à toa que quero experimentar esta vida ao máximo, antes de mim tenho gerações de barrigas famintas. As avós devem estar gritando de tanto dar risada. Reunidas em volta de um fogão de barro lá do outro lado [...] elas devem achar uma loucura ver uma das suas mulheres vivendo de um jeito grandioso.

Rupi Kaur

RESUMO

Os microrganismos são conhecidos pela alta capacidade de produzir compostos bioativos que apresentam uma ampla gama de aplicações. Além dos produtos naturais com potencial biotecnológico produzidos, muitos microrganismos tem sido utilizados no desenvolvimento de bioinsumos agrícolas aplicados no controle de doenças e promoção de crescimento de plantas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo isolar, selecionar e caracterizar espécies de *Bacillus* e *Streptomyces* de sedimentos dos Rios Madeira e Purus com potencial para o controle de fitopatógenos. Foram triados 145 isolados quanto a formação de halos de inibição contra os fungos fitopatogênicos: *Colletotrichum siamense*, *Fusarium decemcellulare* e *Moniliophthora perniciosa*. Com base nos resultados da antibiose, foram selecionados 38 isolados para análise da inibição do crescimento micelial (PIC) que variou de 0 a 90% para pelo menos um dos três fitopatógenos. A identificação molecular com base na região 16S, caracterizou os isolados com atividade antifúngica em dois gêneros: *Bacillus* e *Streptomyces*. De cada gênero, foram selecionados três isolados para caracterização morfológica e testes de atividade contra outros patógenos. Do gênero *Streptomyces* foram selecionados os isolados APUR 32.5, MPUR 40.3, MPUR 46.7, cuja análise filogenética multilocus baseada nos genes *gyrB*, *trpB* e região 16S indicou-os como possíveis novas espécies. Os três isolados de *Streptomyces* foram testados contra outros sete diferentes fitopatógenos (*Corynespora cassicola*, *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum* sp., *Pseudocercospora fijiensis*, *Neopestalotiopsis formicarum*, *Pseudopestalotiopsis gilvanii* e *Rhizoctonia* sp.) indicando que o melhor desempenho foi contra *C. guaranicola*, com valores de PIC variando de 73 a 84%. Já os três isolados de *Bacillus* selecionados (MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1), quando testados contra vários fitopatógenos, apresentaram melhor atividade contra *M. perniciosa* com valores variando de 80 a 88%. A Concentração Mínima Inibitória (MIC) de extratos dos isolados de *Streptomyces* demonstrou inibição de 100% contra *M. perniciosa*. A ação bactericida foi demonstrada pelo extrato do isolado MPUR 40.3 contra *B. cereus* na concentração de 50 ppm. Além da atividade antimicrobiana, os isolados de *Streptomyces* também se mostraram produtores de amilase, celulase, lipase ou protease.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, bioproduto, fitopatógeno.

ABSTRACT

Microorganisms are known for their high capacity to produce bioactive compounds that have a wide range of applications. In addition to the natural products with biotechnological potential produced, many microorganisms have been used in the development of agricultural bio-inputs applied in disease control and plant growth promotion. In this context, the present work aimed to isolate, select and characterize *Bacillus* and *Streptomyces* species from sediments of the Madeira and Purus Rivers with potential for the control of phytopathogens. 145 isolates were screened for the formation of inhibition halos against phytopathogenic fungi: *Colletotrichum siamense*, *Fusarium decemcellulare* and *Moniliophthora perniciosa*. Based on the results of antibiosis, 38 isolates were selected for analysis of mycelial growth inhibition (PIC), which ranged from 0 to 90% for at least one of the three phytopathogens. Molecular identification based on the 16S region characterized the isolates with antifungal activity in two genera: *Bacillus* and *Streptomyces*. From each genus, three isolates were selected for morphological characterization and activity tests against other pathogens. From the genus *Streptomyces*, isolates APUR 32.5, MPUR 40.3, MPUR 46.7 were selected, whose multilocus phylogenetic analysis based on *gyrB*, *trpB* and 16S region genes indicated them as possible new species. The three *Streptomyces* isolates were tested against seven other different phytopathogens (*Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum sp.*, *Pseudocercospora fijiensis*, *Neopestalotiopsis formicarum*, *Pseudopestalotiopsis gilvanii* and *Rhizoctonia sp.*) indicating that the best performance was against *C. guaranicola*, with PIC values ranging from 73 to 84%. The three selected *Bacillus* isolates (MPUR 33.1, MPUR 35.2 and MPUR 44.1), when tested against several phytopathogens, showed better activity against *M. perniciosa*, with values ranging from 80 to 88%. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of extracts from *Streptomyces* isolates showed 100% inhibition against *M. perniciosa*. The bactericidal action was demonstrated by the extract of the isolate MPUR 40.3 against *B. cereus* at a concentration of 50 ppm. In addition to their antimicrobial activity, *Streptomyces* isolates were also shown to produce amylase, cellulase, lipase or protease.

Keywords: Antimicrobial activity, bioproduct, phytopathogen.

SUMÁRIO

Introdução.....	12
1. Referencial teórico.....	15
1.1 <i>Amazônia</i>	15
1.2 <i>Actinobactéria</i>	18
1.3 <i>Aplicação biotecnológica de Actinobactérias</i>	22
1.4 <i>Bacillus</i>	25
1.5 <i>Aplicação biotecnológica de Bacillus</i>	26
2. Objetivos.....	29
2.1 <i>Objetivo geral:</i>	29
2.2 <i>Objetivos específicos:</i>	29
3. Metodologia	30
3.1 <i>Coleta e isolamento</i>	30
3.2 <i>Triagem de bactérias produtoras de compostos antifúngicos</i>	31
3.3 <i>Caracterização morfológica</i>	32
3.3.1 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	33
3.3.2 <i>Tolerância a temperatura e pH</i>	34
3.4 <i>Caracterização molecular</i>	34
3.4.1 <i>Extração de DNA</i>	34
3.4.2 <i>Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)</i>	35
3.4.3 <i>Reação de sequenciamento</i>	36
3.6 <i>Extração de Metabólitos</i>	37
3.7 <i>Perfil químico dos extratos brutos</i>	38
3.8 <i>Concentração Mínima Inibitória (MIC)</i>	38
3.9 <i>Análise estatística</i>	39
4. Resultados e discussão.....	40

4.1 Coleta e Isolamento.....	40
4.2 Característica morfológica.....	40
4.3 Seleção de bactérias produtoras de antifúngico.....	41
4.3.1 Seleção de <i>Streptomyces</i> e <i>Bacillus</i> contra diferentes patógenos de importância agrícola	44
4.4 Identificação Molecular	48
4.4.1 Caracterização molecular dos isolados de <i>Streptomyces</i>	53
4.4.2 Caracterização morfológica e fenotípica dos isolados de <i>Streptomyces</i> spp.....	56
4.4.3 Avaliação da tolerância a temperatura e pH dos isolados de <i>Streptomyces</i>	58
4.4.4 Concentração Mínima Inibitório (MIC)	60
4.4.5 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	62
Conclusão.....	67
Perspectivas.....	67
REFERÊNCIAS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados.....	32
Tabela 2. Lista de <i>primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento	35
Tabela 3. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	35
Tabela 4. Composição dos meios de cultura utilizados para atividade enzimática.....	36
Tabela 5. Revelação dos halos dos ensaios enzimáticos.....	36
Tabela 6. Avaliação da inibição do crescimento micelial (PIC) de <i>Colletotrichum siamense</i> , <i>Fusarium decemcellulare</i> e <i>Monilliothora pernicioso</i> por bactérias isoladas dos rios Madeira e Purus.....	42
Tabela 7. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Streptomyces</i> APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7.....	56
Tabela 8. Crescimento em diferentes temperaturas e pHs dos isolados de <i>Streptomyces</i> APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7.....	59
Tabela 9. Concentração Mínima Inibitória de extratos dos isolados APUR 32.5; MPUR 40.3 e MPUR 46.7 contra diferentes fitopatógenos.....	60
Tabela 10. Susceptibilidade antimicrobiana de extratos de <i>Streptomyces</i> contra patógenos humanos.....	61
Tabela 11. Análise qualitativa de sensibilidade antimicrobiana dos isolados APUR 32.5; MPUR 40.3 e MPUR 46. 7.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura demonstrando a características de diferentes actinobactérias.....	19
Figura 2. Esporos dos diferentes gêneros de actinobactérias.....	20
Figura 3. Ciclo de vida de actinobactérias filamentosas.....	21
Figura 4. Esquema demonstrando a ação dos antibióticos na célula procariótica.....	22
Figura 5. Levantamento de compostos antimicrobianos identificados de actinobactérias.....	24
Figura 6. Pontos de coletas realizadas nos rios Madeira e Purus.....	30
Figura 7. Extrato dos isolados APUR 32.5; MPUR 40.3 e MPUR 46. 7.....	38
Figura 8. Número de bactérias isoladas em meio de cultura AIA e ISP2 dos rios Madeira e Purus.....	40
Figura 9. Diversidade morfológica de bactérias filamentosas isoladas dos Rios Madeira e Purus.....	41
Figura 10. Antagonismo de bactérias isoladas dos rios Madeira e Purus aos fitopatógenos: <i>C. siamense</i> , <i>F. decemcellulare</i> e <i>M. pernicioso</i>	44
Figura 11. Índice de inibição de crescimento micelial (PIC) de fitopatógenos distintos por <i>Streptomyces</i> spp.....	45
Figura 12. Antagonismo das bactérias APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 isoladas dos rios Madeira e Purus aos fitopatógenos.....	46
Figura 13. Índice de inibição de crescimento micelial (PIC) de fitopatógenos distintos por <i>Bacillus</i> spp.....	47
Figura 14. Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene 16S dos isolados e espécies intimamente relacionadas dentro do gênero <i>Bacillus</i>	49
Figura 15. Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene 16S dos isolados e espécies intimamente relacionadas dentro do gênero <i>Streptomyces</i>	52

Figura 16. Análise filogenética dos isolados APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 e táxons relacionados baseada no método NJ (Neighbor Joining) a partir das sequências parciais concatenada do 16S e dos genes <i>gyrB</i> e <i>trpB</i>	54
Figura 17. Análise filogenética dos isolados APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 e táxons relacionados com base no método da Máxima Verossimilhança (ML) baseada na análise das sequências parciais concatenada do 16S e dos genes <i>gyrB</i> e <i>trpB</i>	55
Figura 18. Característica morfológica do isolado APUR 32.2, MPUR 40.3 e MPUR 46.7....	57
Figura 19. Características morfológicas dos isolados APUR 32.2, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 de <i>Streptomyces</i> em diferentes meios de cultura.....	58
Figura 20. Fração 1 / APUR 32.5: Acetato de etila/Metanol 9:1; UV 366.....	63
Figura 21. Fração 2 / MPUR 40.3: Acetato/ Metanol 9:1- (A) Luz visível; (B)UV 254 nm; (C)UV 366 nm.....	63
Figura 22. Fração 3 / MPUR 46.7: Acetato/ Hexano 9,5:0,5 - 254 nm/366 nm.....	64
Figura 23. Índice Enzimático (IE) dos isolados de <i>Streptomyces</i> em temperaturas e pH distintos.....	65

Introdução

Amazônia possui extensão territorial de aproximadamente 5 milhões de Km² de floresta tropical, sendo a maior região natural da América do Sul (IBGE, 2019), ocupando quase 50% do território brasileiro, abrangendo os estados do Amazonas, Acre, Amapá, Roraima, Pará, Rondônia e perpassando pelos estados de Mato Grosso, Tocantins e Maranhão. Inclui também os países que fazem fronteiras com a região norte de Brasil (Val, 2019). Nela ainda é encontrada a maior bacia hidrográfica do mundo (Junk et al., 2015; Wittmann et al., 2017), percorrendo cerca de 6.992 km² de água doce até a foz no oceano atlântico, sendo esta, a maior fonte de água doce do planeta (Casas 2019; Val 2019).

Neste ecossistema são encontrados aproximadamente 30 mil espécies de plantas (EMBRAPA, 2018), sendo 400 espécies aquáticas só em área de várzea (Val, 2019) e de acordo com Wittmann et al. (2017), 1/3 de todas as árvores do mundo são encontradas na região amazônica. Quando se trata da fauna, os dados são impressionantes, com mais de 3.000 espécies de peixes (Sylvain et al., 2019; Val, 2019), 1.300 espécies de aves (EMBRAPA, 2018), 350 de répteis, 163 anfíbios (Sylvain et al., 2019) e segundo o Instituto Sociedade, População e Natureza (2020) 2,5 milhões de artrópodes.

Estudos de Marden e colaboradores (2020) enfatizam que de todos os seres vivos existentes, apenas 15% foram descritos até hoje. No que se refere ao número de espécies existentes na Terra, os dados ainda permanecem muito incertos. Por exemplo, procariotos, foram estimados em 10⁶ de procariotos no planeta (Louca et al., 2019), contudo Lennon e Locey (2020) refutam tal informação estimando que existem 10¹² ou mais procariotos. De todas as espécies descritas, cerca de 70-90% são bactérias (Larsen et al., 2017) e a maior diversidade desse grupo é concentrada em regiões tropicais e subtropicais, onde a Amazônia está inserida. Apesar da alta diversidade de bactérias, cientistas acreditam que são poucos os estudos realizados na Amazônia (Wittmann et al., 2017; Casas 2019; Val 2019), principalmente quando se trata da biodiversidade de água doce de ambientes tropicais (Wittmann et al., 2017) incluindo a microbiota.

Os microrganismos são conhecidos pela capacidade de produzir metabólitos secundários em grande escala, capazes de inibir ou até matar os agentes causais de diversas doenças em animais e vegetais (Lo Grasso et al., 2016; Ranjani et al., 2016; Thampi e Bhai 2017; Lawson, 2018; Salwan e Sharma, 2020). Estes, podem ser encontrados em praticamente todos os lugares, desde os mais inóspitos até os mais comuns, possuindo desta forma

características importantes para o ciclo biológico (Lo Grasso et al., 2016; Ranjani et al., 2016; Lawson, 2018).

Entre os microrganismos produtores de metabólitos secundários, destacam-se as actinobactérias, maior grupo dentro do domínio *Bactéria*. Pertencentes ao grupo de bactérias Gram-positivas com alto conteúdo C+G (citosina e guanina), são reconhecidas por apresentarem em sua maioria, características filamentosas e produtoras de esporos (Lo Grasso et al., 2016; Ranjani et al., 2016; Law et al., 2018; Salwan e Sharma, 2020). Essas bactérias também desempenham papéis importantes na decomposição de materiais orgânicos, tais como celulose e quitina, desempenhando desta forma, um papel vital na rotatividade de matéria orgânica e ciclo de carbono, reabastecendo o fornecimento de nutrientes no solo, sendo importante na formação de húmus (Lewin et al., 2016; Ranjani et al., 2016; Wink et al., 2017).

As actinobactérias ganharam destaque na década de 40, quando Selman Waksman direcionou seus estudos para este grupo de bactérias inspirado na descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928. Waksman após diversas tentativas conseguiu isolar a estreptomicina de *Streptomyces griseus*, sendo este o primeiro antibiótico efetivo no tratamento contra *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal da tuberculose (Wenzel, 2020). Atualmente as actinobactérias são os principais microrganismos com potencial para produção de antibióticos e de outros compostos terapêuticamente úteis (Barka et al., 2016; Ranjani et al., 2016; Wink et al., 2017; Law et al., 2020). Devido a grande quantidade da produção de compostos químicos desses microrganismos, os mesmos são chamados de biofábricas de novas enzimas (Vaijyanthi et al., 2016). Os metabólitos secundários produzidos por actinobactérias incluem antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, anticâncer, anti-algal, anti-helmíntico, antimalárico, anti-inflamatório e imunossupressores (Barka et al., 2016; Lawson, 2018; Law et al., 2020). Além dos metabólitos secundários a produção de enzimas desempenham um importante papel na ciclagem de matéria orgânica no ecossistema do solo e tem aplicações biotecnológicas (Barka et al., 2016; Ranjani et al., 2016; Law et al., 2018; Lawson, 2018; Salwan e Sharma, 2020).

Assim como Actinobactéria, o filo Firmicutes também abriga bactérias gram-positivas, como é o caso dos *Bacillus*, que formam colônias com formato irregulares e esbranquiçadas quando crescida em meio de cultura. Sua célula, como o próprio nome sugere, tem formato de bastonetes (Kuebutornye et al., 2019). Podem ser encontradas em ambientes distintos e dependendo do subgrupo que estiver inserido, podem também apresentar risco a saúde animal e de plantas, todavia, há diversos grupos conhecidos como produtores de uma grande variedade

de antimicrobianos (Shafi et al., 2017; Kuebutornye et al., 2019), que de acordo com Fira et al. (2018), este grupo possui cerca de 5 a 8% do genoma completo voltado à produção de metabólitos secundários.

Um dos pontos positivos das espécies de *Bacillus* é a capacidade de replicação rápida, assim como a resistência a condições ambientais distintas e capacidade de controle de fitopatógenos em grandes culturas agrícolas, tal fato se dá, devido sua capacidade de produzir endósporos resistentes e antibióticos capazes de inibir ou até extinguir fitopatógenos (Shafi et al., 2017; Zhao et al., 2018). Além de produção de antibióticos, os *Bacillus* podem produzir compostos voláteis capazes de promover o crescimento de plantas e ativar mecanismos de resistência sistêmica induzida (ISR) (Shafi et al., 2017).

Esses microrganismos são considerados fontes promissoras de novos bioativos que compõem uma ampla gama de atividade biológica, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de soluções aplicadas à agricultura, meio ambiente e setores como as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias.

Considerando que o aumento da utilização de produtos químicos na agricultura tomou proporções avassaladoras e o uso indiscriminado vem causando diversos problemas tanto para saúde de agricultores, como para o meio ambiente, alternativas sustentáveis precisam ser discutidas e assim, ganhar espaços nas práticas agrícolas. E deste modo, bactérias do gênero *Streptomyces* e *Bacillus* são alternativas favoráveis para utilização de biocontrole em grandes e pequenas culturas agrícolas.

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial para a produção de bioativo com base em *Streptomyces* e *Bacillus* isolados de diferentes rios da região amazônica, visando selecionar e identificando bactérias que possam ser aplicadas ao controle de patógenos de interesse agrônomo, ecológico/ambiental e farmacêutico.

1. Referencial teórico

1.1 Amazônia

A Amazônia abrange uma área de aproximadamente 4,2 milhões de quilômetros quadrados de floresta tropical, dentro do território brasileiro (Costa e Alves, 2018), equivalendo a 1/3 das reservas de florestas tropicais úmidas, abrigando o maior estoque de fauna e flora do mundo. Dentro deste bioma, localiza-se a maior bacia hidrográfica, cobrindo aproximadamente 6.000.000 km², produzindo cerca de 16% da descarga de água doce (Oberdorff et al., 2019) e uma extensa quantidade de minerais (Costa e Alves, 2018). De acordo com Pacheco et al. (2012) e Nobre (2014), as águas doces de todo planeta corresponde a 3%, sendo que 1/5 dessa água é resultante da descarga do rio Solimões/Amazonas no oceano Atlântico.

Segundo Junk (1989), as águas e as terras possuem uma relação de circularidade na Amazônia. Essas águas são responsáveis pelos transportes de sedimentos provenientes de processos de erosão, formando e transformando as paisagens por todo trajeto do rio. Nobre (2014) ainda acrescenta que o regime fluvial altera química e fisicamente as rochas, transportando partículas em suspensão e sais minerais para o fundo dos rios, lagos, igarapés e oceanos. Baseado nisto, o valor das águas não está somente nas paisagens exuberantes cobichados mundialmente, mas sim na manutenção da vida de diversas espécies vegetais, animais, contribuindo também para obtenção de solos férteis, rico em nutrientes. Além disso, os materiais e organismos componentes dos solos dependem do movimento e das propriedades das águas amazônicas conduzidas nos pulsos de inundação, ou seja, toda biodiversidade está relacionada direta ou indiretamente com a água e seus processos.

Os fatores ligados à temperatura, intensidade de chuvas e escoamento das águas superficiais influenciam significativamente na desagregação dos solos e na cobertura vegetal, contribuindo com as taxas de erosão. A litologia e o relevo determinam as condições de escoamento das águas da bacia, assim como os processos de erosão, de transporte e de sedimentação são sensíveis às mudanças climáticas globais (Julien, 1995; Aalto et al., 2003; Filizola e Guyot, 2011), contribuindo de forma indireta com a dinâmica de transferências de matéria da superfície terrestre para aquática.

A teoria da dinâmica do pulso de inundação de Junk (1989) que analisa a complexidade dos ecossistemas aquáticos amazônicos e a conexão entre os sistemas aquáticos e a floresta, juntamente com a teoria do Rio Contínuo de Vannote (1980) que mostra a integração entre as características biológicas dos sistemas aquáticos e o ambiente físico geomorfológico justificam

os processos erosivos que ocorrem nas bacias de drenagem, os processos de deposição sedimentar e a troca de nutrientes de organismos entre a planície de inundação e os rios.

Na Amazônia é nítida a relação íntima entre floresta e água, cujas propriedades químicas e físicas são fatores determinantes da composição e riqueza de espécies biológicas, havendo diferenças significativas de densidade e diversidade entre as áreas alagadas por rios de água branca, preta ou clara (Fonseca, 2011). O canal principal de um rio é formado por tributários com diferenças químicas, físicas e biológicas, visto que cada um desses tributários drenam as áreas com suas particularidades geológicas e biológicas. Os tributários quando se juntam, formam redes que expressam a totalidade dos compartimentos de drenagem, com isso, o rio deve ser visto como parte de uma rede de drenagem (Calijuri e Bubel, 2006; Ferreira e Miranda, 2016). A relação entre tipos florestais e bacias hidrográficas leva a indicação de que a divisão florística da hileia amazônica é associada aos rios, solos e topografia. Essas relações associadas às características dos climas definem os tipos de água da região amazônica, sendo elas: brancas, pretas e claras (Souza et al., 2012).

Os rios de águas brancas têm suas nascentes principalmente nos Andes, como é o caso dos rios: Amazonas, Purus, Madeira e Juruá, sendo eles, ricos em sedimentos suspensos, com pH próximo ao neutro, variando de 6 a 7. Já os rios de águas pretas nascem nos escudos das Guianas e do Brasil Central ou nos sedimentos do terciário da bacia Amazônica, como o rio Negro, onde suas águas são de coloração escura, porém são mais transparentes que as águas brancas, possuindo baixas quantidades de sedimentos suspensos e nutrientes, com pH variando de 3 a 5. Por sua vez, os rios de águas claras drenam áreas dos escudos das Guianas e do Brasil Central, como os rios Tapajós e Xingu, sendo estes, transparentes em várias tonalidades de verde, com pouco material em suspensão, com pH variando de 4 a 7 (Cunha et al., 2008; Ferreira e Miranda, 2016).

Nestas regiões a biodiversidade encontrada está diretamente ligada aos ecossistemas fluviais complexos e dinâmicos. De acordo com Barlow e colaboradores (2018), mais de 3/4 de todas as espécies de animais e vegetais do planeta, encontram-se nas regiões tropicais, Wittmann et al. (2017) em seus estudos, apontam que do total de 2.453 espécies de árvores realizadas em um levantamento florístico dos cinco biomas brasileiros, a Amazônia sozinha respondeu por quase metade das espécies, tal fato está relacionado com os diferentes habitats nela existentes, tais como as florestas de várzea, igapós e campinaranas. Em 2016, o pesquisador Mario Cohn-Haft liderou uma expedição em diversas serras amazônicas entre os estados Amazonas e Roraima e a Venezuela, resultando na descrição de mais de 80 novas

espécies entre animais e plantas (INPA, 2017). Já para ictiofauna, Val (2019) enfatiza que existem cerca de três mil espécies de peixes já conhecidos nos rios amazônicos, porém ainda acredita-se que novas espécies possam ser descobertas. A exemplo deste, Carvalho e Reis (2020) descreveram recentemente uma nova espécie de *Acanthobunocephalus*, peixe da família Aspredinidae encontrado no baixo rio Purus, na bacia Amazônica.

Baseado no que foi exposto, percebe-se que a Amazônia não é apenas a floresta tropical mais diversificada do mundo, mas também é a região da América tropical que mais contribuiu e contribui para a diversidade do planeta (Antonelli et al., 2018). Pesquisadores acreditam que muitos estudos ainda podem ser explorados visando a resolução de diversas problemáticas ambientais muitas vezes causadas pelo próprio homem (Val, 2019). No entanto, atualmente a Amazônia vem sendo alvo de muitas preocupações, devido ao desmatamento e suas implicações no regime hidrológico, acarretando danos ao meio ambiente e sendo alvo de interesses exploratórios, por conta de seus recursos hídricos (Ferreira e Miranda, 2016). Além do exposto, existe também a problemática relacionada as mudanças climáticas, resultante de diversos desequilíbrios ecológicos causadas principalmente por ações antrópicas, as quais vêm afetando a biota aquática, pois as águas ficam mais quentes, mais ácidas e com menos oxigênio, afetando diretamente toda biota daquela região (Val, 2019).

Outra preocupação alarmante é o uso indiscriminado de antibióticos (Nakashima, 2018) e/ou liberação e produtos químicos, utilizados na agricultura, que oferecem riscos tanto ao meio ambiente como ao homem. Em virtude disso, existem esforços na busca de novos compostos bioativos, principalmente advindos dos microrganismos, pois os mesmos vêm ganhando destaque por conta do alto potencial das moléculas bioativas sintetizadas (Barka et al., 2016; Meij et al., 2017; Nakashima 2018). Contudo, Doherty et al. (2017) destacam que, apesar do bioma amazônico possuir uma grande biodiversidade, existem poucos estudos nesta região, principalmente voltados aos padrões de diversidade e potencial biotecnológico de origem microbiana em rios tropicais. Wittmann et al. (2017) também enfatizam que os estudos sobre a biodiversidade terrestres e marinhas estão aumentando, porém, as águas doces dos rios tropicais vem sendo negligenciadas, logo, estudos sobre a microbiota dos rios amazônicos podem resultar nas descobertas de novos microrganismos com potencial biotecnológico, capazes de sintetizar novas moléculas no controle de pragas e doenças de culturas agrícolas importantes para o país. Considerando a diversidade de microrganismos com potencial biotecnológico, as actinobactérias se destacam pela sua capacidade de produzir metabólitos bioativos aplicados na

agricultura, medicina, veterinária e demais campos da biotecnologia (Meij et al., 2017; Wink et al., 2017).

1.2 Actinobactéria

O grupo das actinobactérias, anteriormente denominada de actinomicetos, são bactérias ubíquas, majoritariamente gram-positivas e saprófitas que apresentam DNA genômico com alto teor de C+G (Grasso et al., 2016; Ranjani et al., 2016; Law et al., 2020). A respiração desses microrganismos pode ser aeróbia, anaeróbia e/ou facultativa (Lewin et al., 2016). Podem ser heterotróficos e quimioautotróficos, contudo, grande parte é quimioheterotrófico, ou seja, usam diversas fontes nutricionais, incluindo polissacarídeos complexos (Barka et al., 2016).

Por apresentar características filamentosas, por muito tempo esse grupo foi classificado como fungo, porém, apesar das semelhanças, as actinobactérias possuem células procarióticas, ou seja, o material genético e os ribossomos encontram-se dispersos no citoplasma (Li et al., 2016) e a parede celular é composta principalmente por uma camada de peptídeoglicano (PG) com espessura de 20 a 80 nm. Esse PG bacteriano nada mais é que um polímero composto por N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico (NAM) associados por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), além de PG a parede celular desses microrganismos ainda contém arabinogalactano, lipomanano e lipoarabinomanano (Wang e Jiang, 2016; Gomes et al., 2018).

As variações na sequência de aminoácidos das cadeias de peptídeo, proporcionam informações importantes para sua classificação, como por exemplo, na composição da parede celular de alguns grupos de actinobactérias há ácido micólico como no caso do *Mycobacterium*; ácido lipoteicóico que tem a função de homeostasia como nos casos dos *Firmicutes*, *Agromyces* e *Thermibifiba*; já nos casos dos *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Catellatospora*, *Actinoplanes* e *Kribbella*, a parede celular é formada por ácidos teicurônicos e polissacarídeos heteropoliméricos. As *Streptomyces* possuem tanto ácido lipoteicóico como ácidos teicurônicos e polissacarídeos heteropoliméricos na composição de sua parede, assim como uma cadeia de aminoácido conectada a NAM (Wang e Jiang, 2016; Wink et al., 2017).

Recentemente a classificação taxonômica do filo Actinobacteria, é realizada usando a filogenia das sequências do gene do rRNA 16S e é apoiada pela filogenia das sequências dos genomas disponíveis. Com base na filogenia refinada das sequências do gene do rRNA 16S, este grupo é classificado atualmente em 425 gêneros com nomes válidos publicados, estes estão inseridos em 6 (seis) classes, 46 ordens e 79 famílias, incluindo 16 novas ordens e 10 novas

famílias (Salam et al., 2020). O gênero *Streptomyces* possui cerca 972 espécies validadas e 55 subespécies segundo o LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) (<https://lpsn.dsmz.de/>). Por apresentar um grupo extenso, as morfologias celulares se diferenciam significativamente (Figura 1), como é o caso do gênero *Micrococcus* que possui forma de cocos, como o próprio nome sugere. Há também o *Mycobacterium* com formato de bastonetes; o *Micromonospora* com hifas ramificadas contendo esporos; o *Nocardia* com micélios que se fragmentam em cocos e bastonetes; e o *Streptomyces* com hifas aéreas ramificadas de 0,5 a 2 μm (Li et al., 2016; Ranjani et al., 2016).

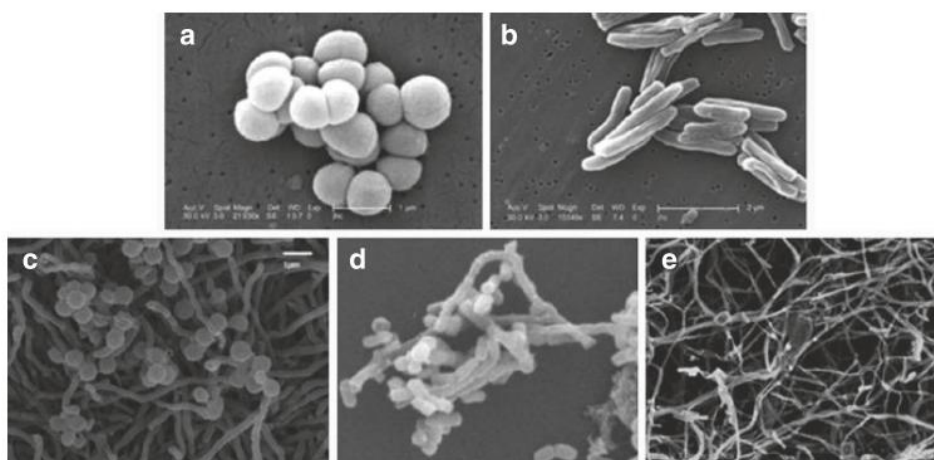


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura demonstrando as características de diferentes actinobactérias. a. *Micrococcus luteus*; b. *Mycobacterium tuberculosis*; c. *Micromonospora schwarzwaldensis*; d. *Nocardia asteroides*; e. *Streptomyces mangro-visoli*. Fonte: Li et al. 2016.

Rosemberg et al. (2014), enfatizou que na maioria dos casos as actinobactérias apresentam diferentes morfologias durante o ciclo de vida e tal alteração muitas vezes está relacionada principalmente com as condições dos meios de cultura, como por exemplo, a *Acidothermaceae* que cresce como filamentos delgados quando a fonte de carbono é glicose ou celobiose, mas quando a fonte de carbono é celulose ou xilana esses micélios crescem em formato de bastões curtos. Ranjani et al. (2016) destaca que o crescimento e as características morfológicas das actinobactérias dependem de fatores nutricionais, químicos e ambientais, ou seja, dependendo das fontes de carbono, temperatura e pH utilizados, essas bactérias podem apresentar características morfológicas distintas, contudo, geralmente elas possuem aparência compacta, aspecto coriáceo, formato cônico, muitas vezes possui micélios vegetativos e é coberto por micélios aéreos.

Os micélios vegetativos possuem uma estrutura delgada, às vezes transparente e em alguns casos podem ficar escuros. Já os micélios aéreos possuem filamentos mais grossos e com brilho, apresenta ainda uma bainha fibrosa, composto por elementos fibrilares e bastonetes

curtos. Visualmente as hifas aéreas apresentam aspecto algodado/aveludado e muitas vezes com pigmentação. Contudo, essas estruturas vão variar de acordo com as espécies e com as condições que forem expostas, incluindo as condições nutricionais e fatores ambientais, como já mencionados acima (Barka et al., 2016).

O crescimento se dá através das ramificações das hifas e a reprodução pode acontecer de duas maneiras: a partir da formação de esporos, dos tipos esporangiósporos ou conidiósporos; e por fragmentação dos filamentos bacilares e cocóides, como é o caso da *Nocardia*. Li et al. (2016) salientam que as cadeias de esporos podem ser divididas de acordo com o tamanho e número de esporos, sendo eles: diporoso, com dois esporos; oligoporoso, com esporos moderados; e poli-esporos, com muitos esporos. Os esporos também são estruturas fundamentais para classificação desses microrganismos (Figura 2) (Barka et al., 2016).

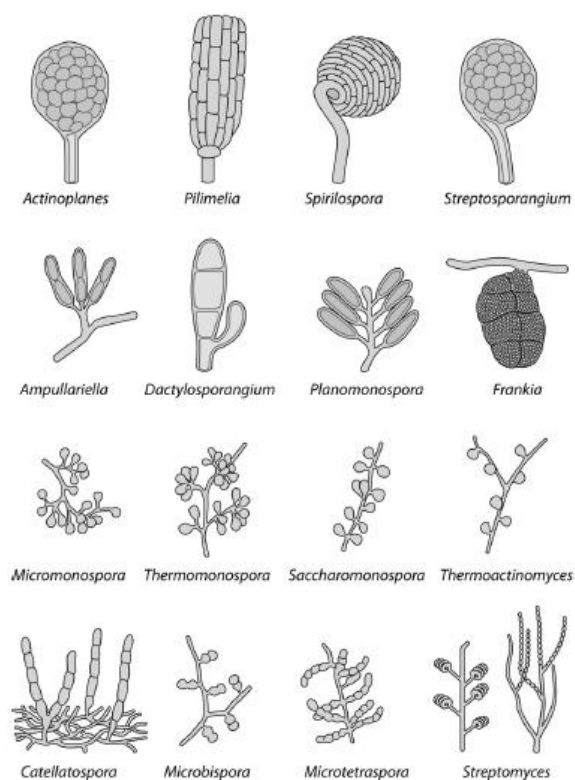


Figura 2. Esporos dos diferentes gêneros de actinobactérias. **Fonte:** Barka et al. 2016

Para exemplificar o ciclo de vida das bactérias filamentosas, Lo Grasso et al. (2016) utilizam a *Streptomyces coelicolor* como modelo. Trata-se de uma bactéria multicelular, visto que, após a germinação dos esporos, o crescimento leva a formação de uma rede ramificada de hifas que penetram o substrato pela extensão das pontas e o crescimento subsequente se dá com a formação de hifas aéreas filamentosas que sofrem diferenciação em cadeias de esporos,

podendo ser observado na Figura 3. A produção de antibiótico e de outros metabólitos secundários acontece durante formação das hifas aéreas. (Barka et al., 2016).

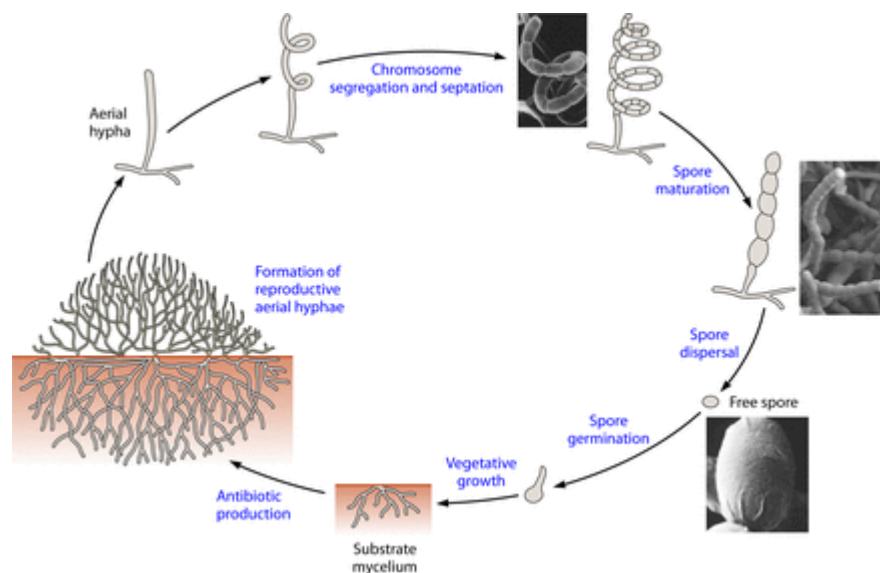


Figura 3. Ciclo de vida de actinobactérias filamentosas. **Fonte:** Barka et al., 2016.

Como já mencionado, as actinobactérias são consideradas ubíquas por serem encontradas em praticamente todos os ambientes (solo, água, microbiota animal e vegetal), desde o mais simples até os mais inóspitos, porém, com mais recorrência nos solos. Elas compreendendo 30% da população total de microrganismos nos solos, sendo responsáveis pela decomposição de matéria orgânica, liberando carbono e nitrogênio naturalmente, sendo estes, elementos essenciais para o crescimento das plantas. São classificadas em termofílicas, acidofílicas, halofílicas, endofíticas, simbióticas e endossimbiontes (Jiang et al., 2016; Lawson, 2018). Podem conviver simbioticamente com plantas e animais, contudo, existem linhagens que podem trazer danos à saúde dos mesmos (Jayashantha, 2015), como por exemplo, o gênero *Mycobacterium*, responsável por diversas patologias humanas, como a tuberculose e hanseníase, adquiridas pelas *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, respectivamente. Há ainda a *Mycobacterium ulcerans*, agente causal da úlcera de Buruli, doença que atinge os tecidos epiteliais, causando ulcerações, como o próprio nome já diz (Gagneux, 2018). Os primeiros estudos realizados com Actinobactéria foi por conta da *Actinomyces bovis* causadora da actinomicose em bovinos, doença desconhecida até 1874 (Waskam, 1959; Dhillon et al., 2020). Vale ressaltar que o grupo das actinobactérias, apesar de parecer simples, é formado por um extenso e complexo grupo de bactérias com presença e ausência de micélios, cada uma com suas particularidades e ciclo de vida distinta, contudo, as bactérias filamentosas

ganharam destaque mundialmente por conta da sua síntese metabólica de compostos bioativos com grande aplicação nas áreas da medicina humana, veterinária, agricultura, biotecnologia e meio ambiente (Law et al., 2020).

1.3 Aplicação biotecnológica de Actinobactérias

A era dos antibióticos começou em 1928, quando Alexander Fleming isolou um fungo produtor de penicilina, inicialmente classificado como *P. chrysogenum*, que foi posteriormente reconhecido como *Penicillium rubens* (Houbraken et al., 2011). A penicilina é um importante antibiótico utilizado até hoje, salvando e aumentando a expectativa de vida de muitas pessoas. Selman Waksman na década de 40 inspirou-se nos estudos de Fleming e isolou a actinomicina de *Actinomyces antibioticus*, sendo este, um dos primeiros antibióticos capazes de inibir o agente causal da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*. Em 1943, Waksman isolou a estreptomicina da cepa *Streptomyces griseus*, antibiótico importante também para o tratamento de tuberculose. Waksman identificou mais de 20 substâncias naturais capaz de inibir o crescimento de patógenos, incluindo a estreptomicina e a neomicina, o mesmo ainda propôs o termo “antibiótico” utilizado até hoje para caracterizar a classe de inibidores do crescimento bacteriano (Kresge et al., 2005).

Antibióticos são compostos químicos que inibem seletivamente o crescimento bacteriano sem prejudicar os organismos eucarióticos. Esses compostos podem agir diretamente tanto nas estruturas como nas funções bacterianas, como por exemplo, na biossíntese da parede celular, replicação de DNA e síntese proteica (Figura 4), impedindo o desenvolvimento bacteriano (Lo Grasso et al., 2016). Wohlleben et al. (2016) afirmam que 90% de todos os antibióticos utilizados em todo o mundo são derivados de microrganismos, os outros 10% são oriundos de organismos superiores, como plantas e animais. Desses produtores de antibióticos microbianos, 80% são de *Streptomyces* somados com actinobactéria raras e 20% são oriundos de fungos (Lo Grasso et al., 2016).

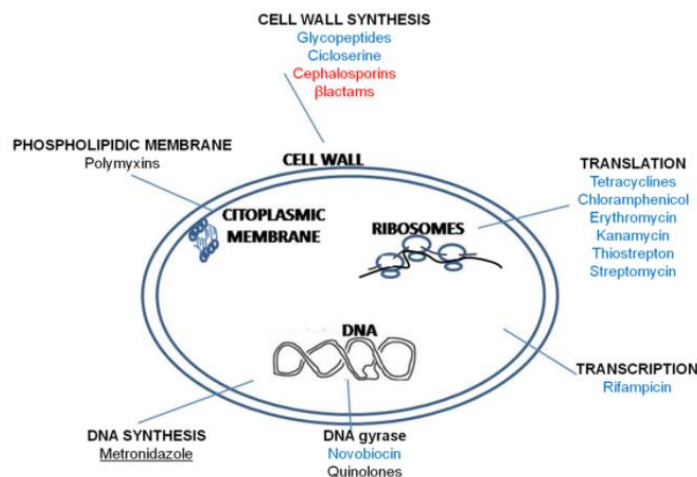


Figura 4. Esquema demonstrando a ação dos antibióticos na célula procariótica. **Fonte:** Lo Grasso et al. 2016.

O período de 1940 a 1970 é conhecido como a Era de ouro dos antibióticos, onde houve uma explosão na descoberta desses produtos, porém com poucos recursos para organizar tais descobertas, resultando em muitos produtos no qual poucos foram explorados e desenvolvidos como drogas, sendo utilizados até os dias de hoje (Johnston et al., 2016). Pode-se perceber tal fato, mediante ao ocorrido durante a pandemia do COVID – 19 onde a vulnerabilidade global do homem a doenças infecciosas, levou a óbito milhões de pessoas e a incerteza do controle infeccioso (Brüssow, 2020). A resistência microbiana está diretamente ligada ao uso indiscriminado de antibióticos (Berdy, 2005; Barka et al., 2016; Udaondo e Matilla, 2020) e este aumento não se limita apenas aos patógenos de animais, onde o homem está inserido, mas também atinge patógenos de plantas economicamente importantes, afetando não só a economia do país, mas a qualidade de vida das pessoas (Udaondo e Matilla, 2020).

Ao que tudo indica a Era de ouro dos antibióticos está de volta, isto graças aos recursos tecnológicos desenvolvidos nos últimos anos, e um exemplo potente é a utilização do sequenciamento de nova geração (NGS) para a obtenção de genomas completos e a mineração de genomas como ferramenta para prospecção de vias biossintéticas voltadas a produção de metabólitos secundários em microrganismos com potencial antimicrobiano. Estudos genômicos indicam que os microrganismos possuem numerosas vias ou clusters de genes biossintéticos (BGC) silenciados, também conhecidos como BGCs crípticos, que podem ser desbloqueados via engenharia genética propiciando inclusive a descoberta de novas moléculas (Barka et al., 2016; Meij et al., 2017).

Wang et al. (2020) demonstrou em seus estudos a quantidade de compostos antimicrobianos isolados de actinobactérias marinhas nos últimos 40 anos, chegando a 313

novos metabólitos bioativos (Figura 5). De acordo com os mesmos, países europeus e norte americano são os que mais investem em pesquisas neste ramo, seguidos da Ásia oriental, e os ambientes mais explorados são de sedimentos marinhos (69.6%), seguidos de esponjas (8.6%), de animais (8.3%), de mangue (4.2%), de algas (2.6%), de plantas (0.6%), e de outros recursos (6.1%).

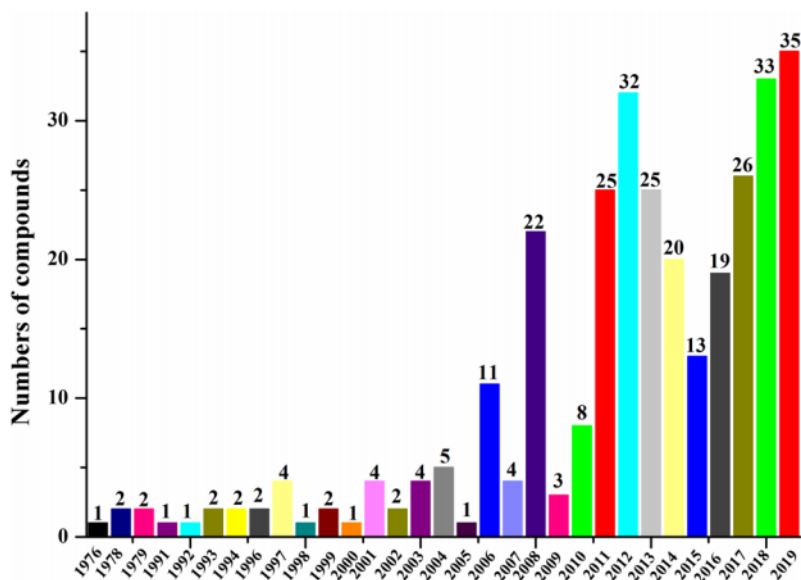


Figura 5. Levantamento de compostos antimicrobianos identificados de actinobactérias. **Fonte:** Wang et al., 2020.

Na agricultura as actinobactérias desempenham papel importante para degradação de matéria orgânica, proteção contra fitopatógenos (Bhatti et al., 2017) e podem também degradar polímeros complexos de restos de plantas e animais mortos (Lewin et al., 2016), resultando na síntese de enzimas extracelulares como lignase, protease, lipase, celulase, xilanase, quitinase, pectinase, queratinase, amilase, dentre outras, sendo estas, enzimas importantes tanto para produção agrícola, como para a indústria (Subramaniam et al., 2016). Uma das principais características desses microrganismos no solo é o equilíbrio biológico que os mesmos oferecem, pois há espécies importantes para fixação de nitrogênio, e a degradação de hidrocarbonetos em solos poluídos (Bhatti et al., 2017). A relação simbiótica entre actinobactérias e plantas pode aumentar e/ou desbloquear a produção de antibióticos que em ambientes laboratoriais não conseguem ser expressos (Meij et al., 2017).

O Brasil atualmente é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, sendo que nos últimos três anos (2018 – 2020), considerando a faixa de risco da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), foram liberados mais de 300 produtos inseridos na categoria 1, 2 e 3 classificados como perigosos ao meio ambiente. Quando comparado com as classes de risco do

IBAMA, 740 produtos foram considerados perigosos (MAPA, 2020). Esses agrotóxicos, também conhecidos como agroquímicos são utilizados na pecuária, em setores de pastagem e também na agricultura, com intuito de combater pragas e doenças que atacam pequenas e grandes culturas agrícolas (Carneiro et al., 2015). Os dados mencionados são preocupantes, visto que a resistência microbiana só tende a aumentar, agravando ainda mais uma das maiores problemáticas sanitárias que enfrentamos atualmente. Além disso, o aumento desses produtos gera diversos impactos ambientais, como o desequilíbrio de populações importantes, por conta das contaminações geradas por estes produtos (Botelho et al., 2020).

Para diminuir o uso de agrotóxicos não só no Brasil, mas no mundo, os bioprodutos apresentam-se como alternativa para uma produção ambientalmente sustentável. Diversos estudos já comprovaram a eficácia de microrganismos, principalmente actinobactérias, como bioprodutos substitutos aos químicos utilizados para tratamento de pragas e doenças (Thampi e Bhai, 2017; Bubici, 2018; Wonglom et al., 2019; Gao et al., 2020; Ling et al., 2020; Sudiana et al., 2020).

Desta forma, considerando a biodiversidade amazônica e o potencial biotecnológico de microrganismos, principalmente actinobactérias, este trabalho teve como propósito isolar e caracterizar actinobactérias de sedimentos dos rios Madeira e Purus para aplicação agrícola, visando impactos econômicos e sociais para o país.

1.4 Bacillus

O gênero *Bacillus* foi descrito pela primeira vez em 1872 por Cohn. Trata-se de bactérias Gram-positivas, com baixo teor de guanina e citosina (GC), formadora de endósporos, quimiotáticas com formato de bastonete e não possuem cápsula (Fritze, 2004; Dunlap et al., 2015; Ehling-Schulz et al., 2019; Kuebutornye et al., 2019; Liu et al., 2019; Son et al., 2019). Sua locomoção geralmente acontece por meio de flagelos peritoneais e sua respiração pode ser aeróbia ou anaeróbia facultativa. Seus esporos podem ser cilíndricos, ovais, arredondados ou em forma de rim (Kuebutornye et al., 2019). Macro morfologicamente forma colônias com aspecto que varia de viscoso a cremoso, esbranquiçado com bordas circulares ou arredondadas (Mandic-Mulec et al., 2015).

Bacillus são microrganismos que vivem em diferentes habitats, sendo considerados seres ubíquos. Sua capacidade de formar endósporos fornece alta resistência ao calor, seca, radiação e produtos químicos, permitindo desta forma, sua sobrevivência em diversas condições por um período de tempo mais longo (Mandic-Mulec et al., 2015). Estudos recentes vem

mostrando a capacidade de resistência deste grupo, principalmente aqueles isolados de ambientes inóspitos, como sistemas quentes e salinos, seja sólido ou líquido, podendo desta forma, ser classificados como termofílicos e halofílicos (Dunlap et al., 2015; Mandic-Mulec et al., 2015; Verma et al., 2018). Há também espécies que podem ser classificados como psicrófilicos, acidofílicos e alcalifílicos (Liu et al., 2019), estes isolados de ambientes extremos são destacados pela produção de uma ampla gama de enzimas extracelulares comercialmente valiosas, principalmente as consideradas termoestáveis, (Mandic-Mulec et al., 2015; Kaspar et al., 2019; Saxena et al., 2019; Valenzuela-Ruiz et al., 2020) como amilase, celulase, lipase, protease, fosfatase, carboxilase, dentre outras (Verma et al., 2018).

Atualmente o referido gênero compreende mais de 406 espécies reconhecidas e descritas até o momento desta escrita (www.bacterio.net/genus/bacillus). Suas principais vantagens sobre as actinobactérias é a capacidade de replicação rápida, mas assim como os *Streptomyces* possuem resistência a condições ambientais peculiares e uma extensa capacidade como controlador biológico, no qual 5 a 8% do seu genoma total é dedicado a biossíntese de metabólitos secundários (Fira et al., 2018).

As moléculas bioativas mais importantes deste grupo são os policetídeos (PKS), peptídeos não ribossomais (NRPs), lipopeptídeos, bacteriocinas e sideróforos, ou seja, podem ser explorados nas indústrias farmacológicas e agrícolas. A FDA (*Food and Drug Administration*) já declarou que a espécie *Bacillus subtilis* é um organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*), considerado seguro para uso em indústrias de processo de alimentos (Shafi et al., 2017; Fira et al., 2018; Saxena et al., 2019). Abaixo, segue detalhes sobre algumas de suas aplicações comercialmente exploradas.

1.5 Aplicação biotecnológica de *Bacillus*

Bacillus spp., assim como as actinobactérias, são conhecidas pela capacidade de sintetizar uma ampla variedade de antibióticos e enzimas, principalmente as hidrolíticas, sendo desta forma, cobiçado pelas indústrias farmacêuticas, agrícolas, alimentícias, cosméticas, têxtil e demais. Todavia, de acordo com Saxena et al. (2019) foram realizados poucos estudos voltados para a indústria da agrobiotecnologia com *Bacillus*, visto que os mesmos possuem diversas funções ecológicas no ecossistema do solo, incluindo a ciclagem de nutrientes até a capacidade de tolerância ao estresse das plantas. Os mesmos ainda enfatizam que o *Bacillus* spp., em sua maioria, possui habilidades benéficas que ajudam o desenvolvimento das plantas direta e indiretamente, por meio da aquisição de nutrientes, promoção de crescimento por meio

da produção de hormônios vegetais, produção de antibióticos contra fitopatógenos e outros estressores abióticos.

A produção de enzimas líticas por *Bacillus* spp., como quitinases, glucanases, lipases e proteases, são fundamentais para degradação de componentes da parede celular dos fungos como quitina, β -glucano e proteínas. *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. velezensis* são conhecidos pela alta produção de quitinases, sendo desta forma, fortes candidatos ao controle de doenças causadas por fungos (Berini et al., 2018). A produção de quitinases também é uma forte indicadora de bioinseticida (Rishad et al., 2017; Subbanna et al., 2019).

Os *Bacillus* spp. também são conhecidos como fontes principais de proteases comercialmente exploradas. Tal fato se dá por conta da sua rápida reprodução, ocupação de pouco espaço, poder de manipulação genética e baixo custo benefício, tornando-as adequada para aplicação biotecnológica (Ali et al., 2016; Razzaq et al., 2019).

A produção de metabólitos secundários oriundos de *Bacillus* spp. é muito explorados na indústrias farmacêuticas e agrícolas, tendo em vista, a elevada resistência de pragas e doenças (Fira et al., 2018; Borriss et al., 2019; Saxena et al., 2019). As biomoléculas mais importantes deste gênero são os policetídeos, peptídeos não ribossômicos (NRPs), bacteriocinas e sideróforos (Fira et al., 2018).

De acordo com Fan et al. (2018), 10% do genoma da espécie *B. velezensis* FZB42 é composta por genes envolvidos na síntese ribossômica e não ribossômica de biomoléculas com atividade antimicrobiana. Além da ação antibiótica, esta cepa quando colocada sob condições bióticas e abióticas produz compostos voláteis (VOC).

Bacillus cereus e *B. anthracis*, apesar da produção de metabólitos secundários, sendo fontes promissoras de biocontrole, estão na lista de microrganismos patogênicos a humanos, excluindo assim, seu uso como controle biológico (Borriss et al., 2019).

Bacillus spp. também são conhecidos por induzir a resistência sistêmica contra diversos agentes patogênicos nas plantas (Pieterse et al., 2014), ou seja, os microrganismos podem estimular mecanismos de defesa contra fungos, bactérias, nematoides, insetos ou qualquer outro organismo que prejudique a saúde da planta. Isso acontece devido a ativação do sistema de defesa da planta. Logo, quando esse sistema é ativado os genes de defesa são expressos, liberando substâncias capazes de afastar o agente causal. Vale ressaltar, que este mecanismo nada tem a ver com substâncias antimicrobianas ou inseticidas, mas sim em induzir a

sensibilidade da planta através de mecanismos de defesa física ou química como resposta ao ataque do agente em potencial (Köhl et al., 2019; Saxena et al., 2019).

Bacillus megaterium, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. cereus*, *B. aryabhatai* dentre outros, são bactérias conhecidas como PGPR (Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas) (Fan et al., 2018), estas são microrganismos benéficos à saúde e ao crescimento das plantas (Bashan et al., 2014). As rizobactérias além de promover o desenvolvimento vegetal, também são agentes de biocontrole (Goswami et al., 2016; Saxena et al., 2019).

Além das indústrias agrícolas, os *Bacillus* spp. vêm ganhando destaque na aquicultura como probiótico (Kuebutornye et al., 2019). Zaineldin et al. (2018) ao adicionar *B. subtilis* na ração de *Pagrus major*, peixe conhecido como dourada no Japão, constatou que o animal apresentou melhoria no desempenho de crescimento, aumentou a resposta imunológica e o microrganismo regulou a atividade das enzimas digestórias. Yi et al. (2018) ao investigar o potencial probiótico de *B. velezensis* JW constatou que além da atividade antimicrobiana contra bactéria patogênicas de peixes como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae* e *Vibrio parahaemolyticus*, também induziu respostas imune nos peixes das espécies *Carassius auratus*, conhecido como peixe japonês. No genoma desta cepa, foram identificados quatro bacteriocinas, três policetídeos e cinco NRP. Os resultados comprovaram que a referida cepa possui potencial como probiótico na aquicultura.

Baseado neste contexto, Dilnashin et al. (2020) acreditam que alternativas sustentáveis é a única válvula de escape capaz de diminuir a utilização de produtos químicos prejudiciais à saúde do meio ambiente. Contudo, Saxena et al. (2019) chamam a atenção para a importância de estudos voltados para a produtividade da cultura em campo, ou seja, torna-se necessário a utilização desses testes *in vivo*. Kuebutornye et al. (2019) enfatizam também a importância de *Bacillus* spp. na aquicultura sustentável como alternativa a melhoria da dieta alimentar, resposta ao estresse, resposta imunológica e resistência a doenças, dentre outros fatores que viabilizam a qualidade de vida na aquicultura.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

- Selecionar *Streptomyces* spp. e *Bacillus* spp. isolados de sedimentos dos rios Madeira e Purus e avaliar o potencial bioativo para aplicação biotecnológica de interesse agrícola.

2.2 Objetivos específicos:

- Isolar *Streptomyces* spp. e *Bacillus* spp. das calhas dos rios Madeira e Purus;
- Realizar a identificação morfológica e molecular dos isolados;
- Selecionar e avaliar *Streptomyces* spp. e *Bacillus* spp. com atividade contra fitopatógenos;
- Selecionar e avaliar *Streptomyces* spp. e *Bacillus* spp. para produção de enzimas extracelulares de interesse industrial.

3. Metodologia

3.1 Coleta e isolamento

As coletas foram realizadas nos meses de setembro a dezembro de 2018, nos leitos dos rios Madeira (07°30'35.2" S 063°01'08.0" W) e Purus (08°44'24.9" S 067°24'07.8" W), ambos localizados à margem direita do rio Amazonas, no estado do Amazonas, Brasil. Esta coleta foi realizada com apoio do INMETRO, utilizando a Unidade Básica Fluvial de Fiscalização e Pesquisa (UBFFP).

A cada 50 km foram coletadas cinco amostras simples do sedimento de cada rio e misturadas, formando uma amostra composta (Figura 5). Os sedimentos foram coletados com auxílio de uma draga do tipo *petit ponar*. As amostras foram armazenadas em tubos Falcon de 50 mL esterilizados, e posteriormente, foram enviadas sob refrigeração para o laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na rodovia AM 010, km 29, estrada Manaus-Itacoatiara-Amazonas, onde o isolamento, identificação, testes antimicrobianos e atividade enzimática foram realizados.

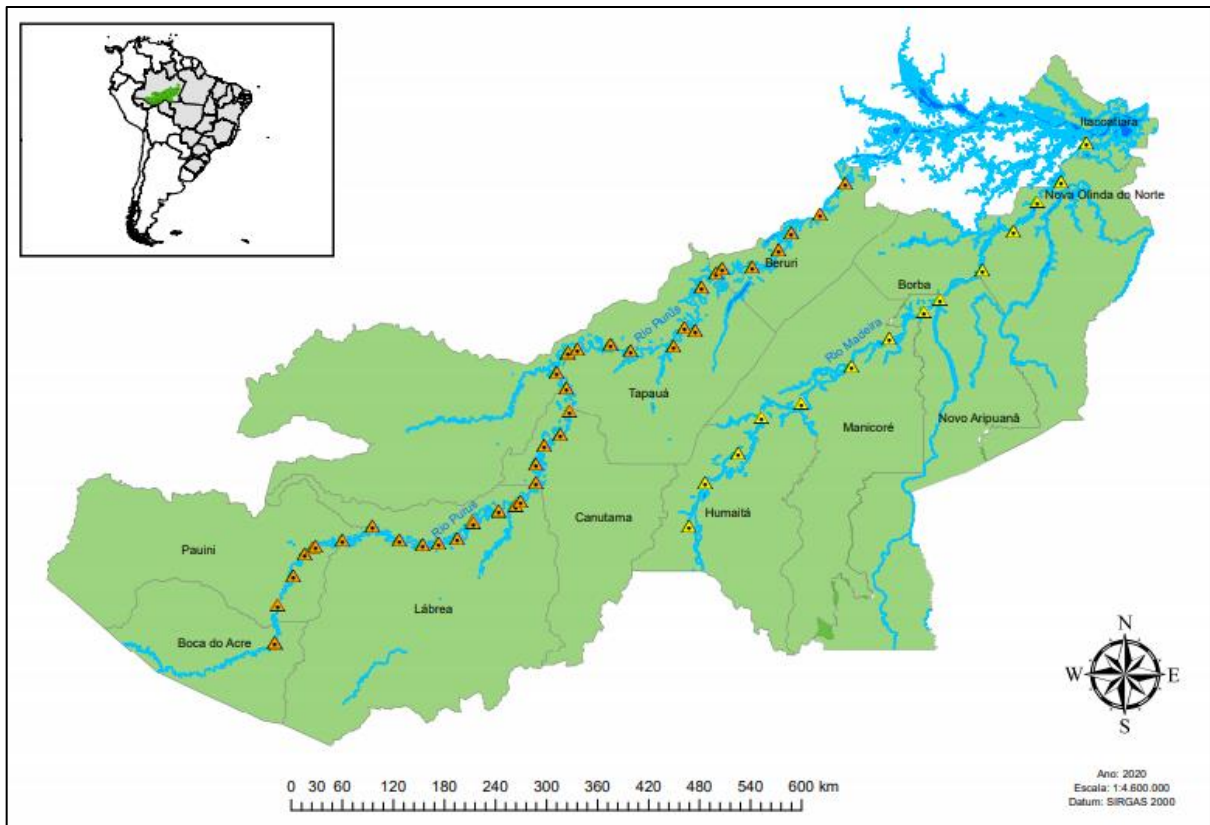


Figura 6. Pontos de coletas realizadas nos rios Madeira e Purus.

O isolamento foi realizado por meio da técnica de diluição seriada, até atingir a concentração de 10^{-3} . Após a diluição, cada ponto foi inoculado em placas de Petri contendo

meio de cultura AIA e ISP2 contendo ácido nalidíxico (5µg/mL) e ciclohexamida (5µg/mL) para eliminação das bactérias Gram-negativas e dos fungos (Tabela 1), em seguida foram incubadas a 28° C durante 7 a 15 dias (Jose e Jha, 2017; Mohamed et al., 2017).

A seleção de actinobactérias foi realizada com base no aspecto das colônias, como presença de micélios ou aspecto coriáceo, enquanto os *Bacillus* spp. foram selecionados pelo aspecto cremoso e esbranquiçado das colônias, seguidos pela técnica de coloração de Gram. A técnica de esgotamento por estria foi utilizada para obtenção das culturas puras. Após a purificação, os isolados foram preservados em glicerol 15% e armazenadas a -80° C (Jose e Jha, 2017).

3.2 Triagem de bactérias produtoras de compostos antifúngicos

Os testes de antibiose foram realizados com 145 isolados inicialmente contra três fitopatógenos: *Colletotrichum siamense* (Coll 2 N), *Fusarium decemcellulare* (Fdc 307) e *Monilliothora pernicioso*.

Testes preliminares foram feitos em placas de Petri (145x15 mm) contendo meio de cultura BDA, sobre o qual foi espalhada uma solução de esporos 10⁶ de *C. siamense* (Coll 2 N) e *F. decemcellulare* (Fdc 307) e em seguida, foram inoculados até 13 isolados por placa das bactérias a serem testadas, o co-cultivo foi incubados a 28° C por 7 dias. Devido a difícil esporulação da *M. pernicioso*, foram dispersos discos contendo micélios por entre os isolados bacterianos e seguiu-se o mesmo tempo e temperatura de incubação dos demais patógenos.

3.2.1 Análise da inibição do crescimento micelial (PIC)

A percentagem do crescimento micelial foi realizado com 38 isolados que apresentaram antibiose com base na análise realizada no item anterior. Os testes quantitativos foram realizados com *C. siamense* (Coll 2 N), *F. decemcellulare* (Fdc 307) e *M. pernicioso* (Mp 01) pelo método de pareamento de cultura dupla (Thampi e Bhai, 2017), onde um disco de micélio de 0,8 cm de cada fitopatógeno foi colocado no centro da placa e nas laterais, com distanciamento de 2 cm das bordas, foram feitas estrias simples com os isolados selecionados, em seguida foram incubados à 28° C e avaliados no 5°, 10° e 15° dia. Os testes foram realizados em triplicatas e a avaliação foi efetuada por meio das medições do diâmetro das colônias, mensurados com paquímetro, definindo desta forma, uma média para cada colônia. Para o controle negativo, utilizou-se somente o fitopatógeno em meio BDA. A percentagem de

inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada de acordo com a fórmula abaixo (Thampi e Bhai, 2017).

$$PIC = \frac{\text{diâmetro médio do controle} - \text{diâmetro médio do tratamento}}{\text{diâmetro médio do controle}} \times 100$$

3.2.2 Análise da amplitude inibitória contra diferentes fitopatógenos

Os três isolados com melhor PIC foram selecionados para análise do percentual de inibição contra sete fitopatógenos distintos: *Corynespora cassiicola* (INPA 2671), *C. guaranicola* (INPA 2939), *Colletotrichum spaethianum* (INPA 2908), *Pseudocercospora fijiensis* (CPAA 240), *Neopestalotiopsis formicarum* (CPAA 609), *Pseudopestalotiopsis gilvanii* (CPAA 222) e *Rhizoctonia* sp. (INPA 2942), utilizando a mesma metodologia citada acima.

3.3 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos isolados que obtiveram maior percentual de inibição contra os fitopatógenos analisados, foram realizada visualmente, verificando a presença ou ausência de micélios aéreos, coloração da colônia e do substrato (Jose e Jha, 2017); e coloração de Gram, quando necessário.

As características fenotípicas foram avaliadas em diferentes meios de culturas (Tabela 1) nas temperaturas 25, 30 e 35° C com pH neutro.

De acordo com Mohamed et al. (2017) a pigmentação do micélio aéreo e a estrutura dos esporóforos são características fundamentais na classificação de actinobactéria. Com isto, foram avaliados o crescimento da colônia, das hifas aéreas, micélios vegetativos e pigmentos solúveis em diferentes meios de cultura (Tabela 1) durante o período de 10 dias conforme os métodos do International *Streptomyces* Project (Shirling e Gottlieb, 1966). O crescimento da colônia foi classificado conforme o modo de crescimento em: bom (++) quando o crescimento vegetativo e micelial ocorreu ao longo de toda a estria; moderado (+) quando o houve crescimento vegetativo e micelial com menor intensidade; e baixo (-) quando houve somente crescimento vegetativo.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados.

Meio de cultura	Composição
ISP1	5g triptona; 3g extrato de levedura; 20g ágar; 1L de água destilada
ISP2	4g extrato de levedura; 10g extrato de malte; 4g dextrose; 20g ágar; 1L de água destilada
ISP3	20g aveia; 18g ágar; 1L de água destilada
LB	10g peptona; 5g extrato de levedura; 5g NaCl; 20g ágar; 1L de água destilada
ACA	10g amido; 0,3g caseína; 2g KNO ₃ ; 2g NaCl; 2g K ₂ HPO ₄ ; 0,05g MgSO ₄ ; 1,02g CaCO ₃ ; 0,01g FeSO ₄ ; 15g ágar; 1L de água destilada
SYEP	0,25g extrato de levedura; 0,5g K ₂ HPO ₄ ; 18g ágar; 1 L de água destilada
V8	200 mL de suco V8; 4,5g CaCO ₃ ; 18g ágar; 800 mL de água destilada
BDA	200g de batata, 20g dextrose, 15g ágar, 1L de água destilada
SNA	1g KH ₂ PO ₄ ; 1g KNO ₃ ; 0,5g MgSO ₄ ; 0,5g KCl; 0,2g glicose; 0,2g sacarose; 20g ágar; 1L de água destilada
AA	17g ágar; 1L de água destilada
AIA	2g caseinato de sódio; 0,1g L-asparagina; 4g propionato de sódio; 0,5g fosfato dipotássico; 0,1g de sulfato de magnésio; 0,001g de sulfato ferroso; 15g ágar; 5mL de glicerol; 1L de água destilada

3.3.1 *Microscopia eletrônica de varredura*

O microcultivo foi realizado na Embrapa Amazônia Ocidental, e a visualização e captura das amostras foram realizadas no Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABio) da Universidade do Estado do Amazonas.

Este procedimento foi realizado de acordo com Li et al. (2016), com algumas adaptações. A técnica de câmara úmida em placa de Petri foi utilizada para o microcultivo dos isolados, no qual um disco de meio ISP2 foi colocado sobre uma lâmina suspensa com canudos em placa de Petri forrada com papel toalha, em seguida os discos foram inoculados com os isolados a serem analisados e sob cada disco colocou-se uma lamínula, o papel toalha do fundo da placa foi umedecido com água destilada. As placas foram incubadas a 28°C, durante 7 dias (fase exponencial de actinobactérias). Em seguida as lamínulas foram retiradas cuidadosamente e tratadas com solução de Bouin durante 30 minutos, para fixação das amostras. Posteriormente as células foram desidratadas com álcool 50%, 70%, 90%, 95% e 100%, respectivamente,

deixando-as descansar por 15 minutos de uma solução para outra. A última lavagem com álcool 100%, repetiu-se por 2x. Após todas as lavagens, utilizou-se acetona 100% para secar as amostras e em seguida as mesmas foram metalizadas com ouro durante 5 minutos, posteriormente foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM-IT500HR).

3.3.2 Tolerância a temperatura e pH

A tolerância dos isolados selecionados foram testados nas seguintes temperaturas: 25, 30, 35, 40, 45 e 50° C. O crescimento dos isolados de *Streptomyces* foi observado em pH 6, 7, 8 em meio de cultura ISP2 durante 7 dias. Os isolados de *Bacillus* foram expostos a pH neutro, em meio LB durante 24 horas.

3.4 Caracterização molecular

Após a triagem para a produção de compostos antifúngicos, 38 isolados que apresentaram antibiose contra *C. siamense* (Coll 2 N), *F. decemcellulare* (Fdc 307) ou *M. pernicioso* (Mp 01) foram identificados com base no sequenciamento da região 16 S. Destes, 10 não foram identificados devido aos seguintes fatores: cinco apresentaram problemas no crescimento para obtenção de DNA (AMAD 9.1, MPUR 27.5, MPUR 36.2, MPUR 40.4 e MPUR 51.6) e cinco não cresceram novamente em meio de cultura.

Para três isolados com maior potencial de inibição (APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7) foi realizada a análise multigênica, utilizando além do 16S, o sequenciamento parcial dos genes da gyrase B (*gyrB*) e triptofano sintase subunidade beta (*trpB*) (Guo et al., 2008; Rong e Huang, 2012; Ayed et al., 2018; Law et al., 2018).

3.4.1 Extração de DNA

Os isolados selecionados foram cultivados em tubos Falcon de 15 mL contendo 10 mL de ISP2 líquido e agitados a 180 rpm a 28° C durante três a sete dias, dependendo do crescimento de cada isolado (Jose e Jha, 2017). Para extração do DNA total utilizou-se o detergente catiônico CTAB 2% (Doyle e Doyle, 1987). Após o crescimento as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, essas células foram repassadas para eppendorf (2 mL) e adicionado sílica, 700µL de CTAB 2% e agitados no TissueLyser durante 20 minutos para que a parede celular se rompesse. Os tubos foram então incubados em banho-maria a 65° C por 30 minutos e agitados delicadamente a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão. Após a incubação, em capela de exaustão, foram adicionados 600µL de CIA

(clorofórmio e álcool isoamílico 1:24) e agitados delicadamente até ficar homogêneo. Foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e retirados cuidadosamente, separando a sobrenadante para um novo tubo. E seguida foram adicionados 400 µL de isopropanol (-20°C) e misturados gentilmente para precipitar o DNA, posteriormente foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos para formar o *pellet*. Cuidadosamente a sobrenadante foi descartada e o *pellet* foi lavado 2x com 1 mL de etanol 70% por 5 minutos e depois lavado novamente 1x com 1 mL de etanol 95% por 2 minutos e aguardou-se a evaporação do etanol. O *pellet* foi ressuspendido em 100µL de tampão TE + RNase e incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. O DNA foi quantificado no nanodrop e a integridade do material foi observada em gel de agarose 0,8%.

3.4.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Os genes foram amplificados utilizando os *primers* descritos na tabela 2.

Tabela 2. Lista de *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento.

Região	Primers	Função
16S	Actino-HF (3' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 5')	Amplificação
	Actino-AR (5' AGGAGGTGATCCAGCCGCAC 3')	
	Actinom 235F (3' CCGTACTCCCCAGGCGGG 5')	Sequenciamento
	Actinom 878R (5' CGCGGCCTATCAGCTTGTTG 3')	
gyrB	gyrBPF (5'GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCACGCGGGCGGCAAGTTCGGC 3')	Amplificação
	gyrBPR (3'GTTGATGTGCTGGCCGTCGACGTCGGCGTCCGCCAT 5')	Sequenciamento
	gyrBF (5' GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCA 3')	
	gyrBR (3' CGCTCCTTGCTCCGCGCCTC 5')	
trpB	TrpBPR (3'TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGGACAGCAGGC 5')	Amplificação
	TrpBPF (5'GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA3')	Sequenciamento
	TrpBF (5' GGCTCACACAAGATCAACAA 3')	
	TrpBR (3' TCGATGGCCGGGATGATGCC 5')	

A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 17,25 µL de água ultra pura autoclavada; 2,5 µL de tampão 1X; 1 µL de dNTPs 10 mM; 1 µL de MgSO₄ 50 mM; 1 µL de cada primer 5 µM; 1 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL; e 0,25 µL de enzima Taq DNA Polimerase 5U/µ (EasyTaq[®] DNA Polimerase, Transgen Biotech). Os parâmetros utilizados na amplificação estão na tabela 3. Os fragmentos de PCR foram separados por meio de eletroforese utilizando gel de agarose de 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador.

Tabela 3. Condições da Reação em Cadeia de Polimerase.

	16 S	gyrB	trpB
Desnaturação inicial	94° C – 3 min	96° C – 5 min	96° C – 5 min
Ciclo de amplificação	40X	35X	35X
Desnaturação	94° C – 20s	96° C – 1 min	96° C – 1 min
Anelamento	65° C – 30s	63° C – 1 min	63° C – 1 min
Extensão	72° C – 1 min	72° C – 2 min	72° C – 2 min
Alongamento	72° C - ∞	72° C - ∞	72° C - ∞

3.4.3 Reação de sequenciamento

As reações de PCR foram tratadas com 0,5 µL de Exo-Sap e incubadas a 37° C/15 min e 80° C/15 min para ativação e desativação das enzimas e em seguida sequenciados usando o kit BrilliantDye v3.1. As reações foram analisadas em sequenciador 3500 GeneticAnalyzer (Thermo Fisher).

As sequências obtidas foram comparadas com acessos depositados no Genbank (Nacional Center for Biotechnology Information-NCBI) e DDBJ (DNA Data Bank Japan) com o auxílio da ferramenta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> e <http://blast.ddbj.nig.ac.jp>).

A inferência filogenética a partir da região 16S foi realizada com base em dataset construído a partir de sequencias acuradas depositadas no Genbank. A identificação filogenética dos isolados APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 foi realizada a partir da análise multilocus das sequências 16S, *gyrB* e *trpB*. Para garantir a acurácia da análise foram utilizados somente sequencias das linhagens mais relacionadas encontrados nos bancos de dados que apresentavam identificação molecular precisa (Maciejewska et al., 2015; Ayed et al., 2018; Law et al., 2020). Os alinhamentos dos genes foram realizados utilizando o software CLUSTAL-W e quando necessário, ajustadas manualmente e as árvores construídas com base no método Neighbor Joining (NJ) com bootstrap de 1000 repetições e a matriz de distância foi gerada usando o modelo de dois parâmetros de Kimura utilizando o Programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

3.5 Atividade enzimática extracelular

A produção de amilase, celulase, lipase e protease foi avaliada com base no índice enzimático (IE). Para tanto os isolados foram inoculados em placas contendo meios de cultura seletivos (Tabela 4), após a inoculação, foram incubadas durante 7 dias em temperaturas

distintas: 25, 30 e 35 °C, com três pH diferentes: 4, 7, 10. O protocolo para a revelação do halo de degradação está descrito na tabela 5.

Tabela 4. Composição dos meios de cultura utilizados para atividade enzimática.

Meio de cultura	Composição
Amilase	5g Peptone; 5g NaCl; 5g extrato de carne; 10g dextrose; 2g de amido; 20g de Ágar; 1L de água destilada
Celulase	1g KH ₂ PO ₄ ; 0,5g MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,5g NaCl; 0,01g FeSO ₄ .7H ₂ O; 0,01g MnSO ₄ .H ₂ O; 0,3g NH ₄ NO ₃ ; 10 Carboximetilcelulose; 12g ágar; 1L de água destilada
Lipase	10g peptona; 5g de NaCl; 0,1g CaCl ₂ .2H ₂ O; 20g Ágar; 10 mL Tween 20; 1L de água destilada
Protease	2g leite em pó desnatado; 5g peptona; 3g extrato de levedura; 15g ágar; 1L de água destilada

Os bioensaios foram realizados em triplicata e a avaliação foi realizada a partir do Índice Enzimático, onde $IE = \frac{\text{diâmetro médio do halo de degradação}}{\text{diâmetro médio do crescimento da colônia}}$ (Sadeghian et al., 2016).

Tabela 5. Revelação dos halos dos ensaios enzimáticos.

Atividade enzimática	Revelação do halo	Referências
Amilase	10 ml de solução de Lugol 0.3% (v/v) durante 5 min. Em seguida, halos serão formados em torno do isolado.	Hankin e Anagnostakis, 1975
Celulase	10 mL de Vermelho Congo (0.1% v/v) por 15 minutos e substituir o referido reagente por 10 mL de NaCl 1 M por mais 15 min. Em seguida, halos serão formados em torno da bactéria.	Ariffin et al., 2006
Lipase	Halos serão formados por cristais esbranquiçados em torno da bactéria.	Sierra, 1957
Protease	Halos serão formados em torno do microrganismo.	Hankin e Anagnostakis, 1975

3.6 Extração de Metabólitos

A obtenção de metabólitos foi realizada para os isolados APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7. Foram usados 3L de meio ISP2 em alíquotas de 200 mL, divididos em erlenmeyers de 250 mL incubados durante 10 dias a 28° C em agitação orbital de 150 rpm.

A extração foi realizada com acetato de etila (EtOAc) 1:1 (v:v). Em funil de decantação fez-se a separação da fase orgânica da aquosa, em seguida a fase orgânica foi separada para frascos limpos e a fase aquosa foi submetida a mais 3 lavagens com a mesma proporção de 1:1 com acetato de etila.

A fase orgânica foi seca no rotaevaporador, no laboratório de Química Aplicada à Tecnologia da UEA (Universidade do Estado do Amazonas) e os extratos brutos foram submetidos a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para separação dos

compostos, assim como para testes de verificação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos extratos contra os fitopatógenos utilizados nos itens 3.2.1 e 3.2.2 deste trabalho, utilizando a técnica de micro diluição em placa.

3.7 Perfil químico dos extratos brutos

Os perfis cromatográficos das frações obtidas da partição líquido-líquido (PLL) dos extratos dos isolados (Figura 6) foram realizadas e analisadas por CCD (cromatografia em camada delgada) e comparadas no laboratório do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA).

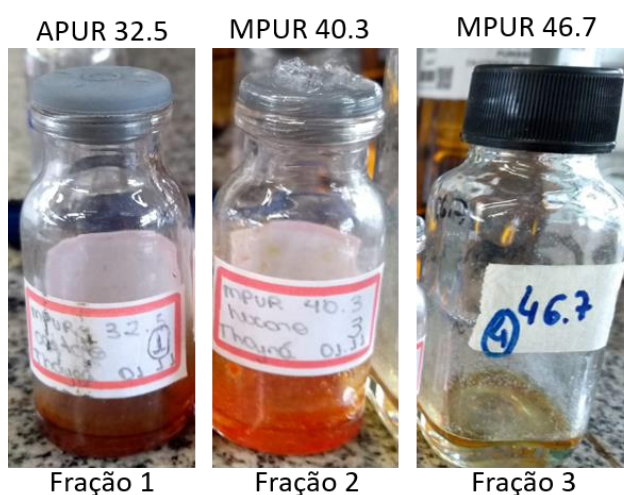


Figura 7. Extrato dos isolados APUR 32.5; MPUR 40.3 e MPUR 46.7

Alíquotas de cada fração foram aplicadas manualmente em cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (Merck Co.). Após a secagem, as placas de CCD foram colocadas em cuba previamente saturada com o eluente da fase móvel. Os sistemas eluentes testados foram misturas polares de solventes orgânicos nas seguintes proporções: acetato de etila/metanol (1:1; 7:3; 8:2; 9:1; 8,5:1,5), clorofórmio/acetato de etila (1:1; 8:2; 7:3; 9:1) e acetato de etila/hexano (1:1, 8:2 e 9,5:0,5). A cuba foi fechada para saturação da placa de CCD e a eluição do solvente feita até 7 cm a partir da aplicação da amostra na placa. Após eluição as placas foram secas e reveladas sob os comprimentos de onda 254 e 366 nm, utilizando o aparelho Luz Ultravioleta (UV) CAMAG REPROSTAR 3. As placas foram fotografadas utilizando o sistema Wincats e seus fatores de retenção foram calculados (R_f), onde $R_f = \frac{\text{distância percorrida pela amostra (da)}}{\text{distância percorrida pelo solvente (ds)}}$.

3.8 Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Os extratos foram diluídos em DMSO 4%, e submetidos a diluição seriada nas seguintes concentrações: 500, 250, 100, 50, 10, 5 ppm. Foram adicionados 50 μ L do extrato nos primeiros

poços com adição 50µL da solução de esporos 10⁶ dos fitopatógenos: *C. siamense*, *F. decemcellulare*, *C. guaranicola*, *C. spaethianum*, *N. formicarum*, *P. gilvanii* e *Rhizoctonia* sp. Para os fungos: *C. cassicola*, *P. fijiensis* e *M. pernicioso* foram usados fragmentos de hifas. Após incubação por sete dias a 28° C as diluições foram analisadas e as concentrações que visualmente não havia crescimento, foram passadas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e inoculadas novamente por mais sete dias na mesma temperatura. O valor do MIC foi definido como a concentração mais baixa de inibição total do crescimento do fitopatógeno (Ling et al., 2020). Além dos fitopatógenos, os extratos também foram testados contra os patógenos *Candida albicans*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos dos testes de antagonismo e enzimáticos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando o software SAS (Statistical Analysis System). O nível de significância foi determinado em $p \leq 0.05$ e 0.01 e utilizou-se Duncan para comparar as médias.

4. Resultados e discussão

4.1 Coleta e Isolamento

Foram isoladas 220 bactérias utilizando os meios de cultura AIA (61) e ISP2 (159 cepas). Estes isolados foram obtidos de 51 pontos de coleta, sendo 14 do rio Madeira e 37 do rio Purus. Dessas, 60 são do rio Madeira e 160 do rio Purus (Figura 8).

Os rios Madeira e Purus localizados a margem direita do rio Amazonas e são caracterizados pela riqueza de sedimentos suspensos, tanto dissolvidos, como sólidos, sendo consequentemente, duas bacias hídricas (Wittmann et al., 2017).

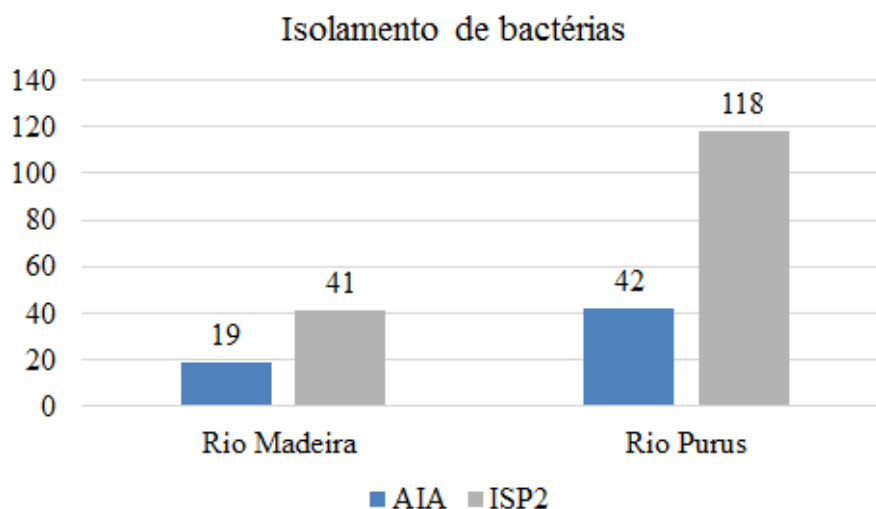


Figura 8. Número de bactérias isoladas em meio de cultura AIA e ISP2 dos rios Madeira e Purus.

4.2 Característica morfológica

Os isolados de actinobactérias foram classificados de acordo com o *Projeto Internacional de Streptomyces* (Ranjani et al., 2016) considerando as estruturas das colônias, presença e coloração de micélios aéreos e vegetativos, e pigmentação solúvel no substrato (Figura 9). Os *Bacillus* spp. selecionados foram confirmados a partir da técnica de coloração de Gram, observando a coloração da parede estruturas em forma de bastonete.

A ordem dos Actinomycetales possui um extenso grupo de microrganismos com muitas particularidades e diversidades morfológicas, porém, a maioria das bactérias são filamentosas e possuem aparência coriácea com superfície cônica, muitas vezes revestida por micélios aéreos, que lembram as estruturas miceliais dos fungos. O que diferencia os actinomycetos dos fungos são as estruturas celulares, não contendo quitina e celulose, sendo estas características específicas dos grupos fúngicos, o diâmetro dos esporos, sendo estes inferiores aos dos fungos, e a reprodução por meio de fragmentos e/ou oidia que são similares quanto ao tamanho e

formato esférico e de hastes, característicos de bactérias (Barka et al., 2016; Lo Grasso et al., 2016; Wang and Jiang, 2016; Lawson, 2018)

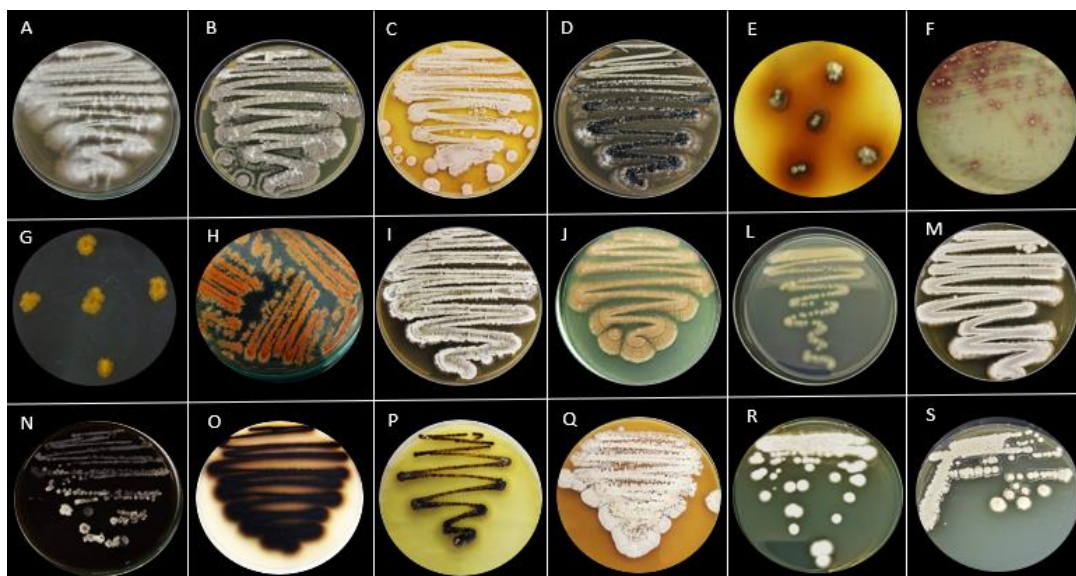


Figura 9. Diversidade morfológica de bactérias filamentosas isoladas dos rios Madeira e Purus. (A) MPUR 30.6, (B) MPUR 16.1, (C) MPUR 21.2, (D) MPUR 31.3, (E) MPUR 16.2, (F) APUR 35.7, (G) APUR 22.1, (H) MPUR 27.4, (I) MPUR 28.3, (J) APUR 32.5, (L) AMAD 5.1, (M) MPUR 26.1, (N) MPUR 42.4, (O) APUR 20.1, (P) MPUR 40.3, (Q) MPUR 46.7, (R) MPUR 30.2, (S) MPUR 28.3.

Durante o isolamento, verificou-se que o mesmo isolado apresentava características distintas quando colocado em condições diferentes, mudando a coloração dos micélios e/ou dos substratos. Tal comportamento pode ser explicado por conta da alta variabilidade gênica que o grupo dessas bactérias possui. Com isso, dependendo das condições que os isolados foram expostos como: meio de cultura, como fonte de carbono, pH e temperatura, os aspectos morfológicos e fisiológicos poderão variar.

4.3 Seleção de bactérias produtoras de antifúngico

Dos 220 isolados preservados 75 apresentaram dificuldades na reativação e os 145 restantes foram testados quanto a antibiose contra três fungos fitopatogênicos, sendo eles: *C. siamense* (Coll 2 N), *F. decemcellulare* (Fdc 307) e *M. pernicioso* (Mp 01). Com base critério mencionado foram selecionados 38 isolados que apresentaram atividade antagonica para pelo menos um dos três fitopatogênicos. Este conjunto de isolados selecionados foram então submetidos a análise quantitativa da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e os resultados obtidos indicam que a inibição variou de 0 a 90% (Tabela 6).

Dentre os 38 isolados testados, 16 obtiveram PIC superior a 52 % variando até 87% contra *C. siamense*. Contra *F. decemcellulare*, 22 isolados mostraram inibição do crescimento

micelial acima de 50% chegando a 80%. O antagonismo contra *M. Perniciosa* foi o mais promissor, pois dos 38 testados 27 apresentaram PIC superior a 50%, alcançando até 90% como pode ser observado na Tabela 6.

Quando comparados entre si, 13 isolados obtiveram PIC superior a 50% para os três isolados, com valores de 87% para *C. siamense* do isolado MPUR 46.7; 80% para *F. decemcellulare* dos isolados MPUR 27.5 e MPUR 46.7; 90% para *M. perniciosa* do isolado MPUR 51.6.

Tabela 6. Avaliação da inibição do crescimento micelial (PIC) de *Colletotrichum siamense*, *Fusarium decemcellulare* e *Monilliothora perniciosa* por bactérias isoladas dos rios Madeira e Purus.

N°	Isolado	Ponto de coleta	Rio	<i>C. siamense</i> (%)	<i>F. decemcellulare</i> (%)	<i>M. perniciosa</i> (%)
1	AMAD 7.1	7	Madeira	0	0	33
2	AMAD 9.1	9	Madeira	67	53	75
3	APUR 16.4	16	Purus	24	47	44
4	APUR 20.1	20	Purus	46	71	70
5	APUR 22.1	22	Purus	0	61	64
6	APUR 26.2	26	Purus	0	43	0
7	APUR 32.5	32	Purus	65	63	79
8	APUR 36.3	36	Purus	55	61	69
9	APUR 37.1	37	Purus	83	67	81
10	MMAD 11.6	11	Madeira	0	0	31
11	MMAD 14.1	14	Madeira	0	0	52
12	MPUR 15.1	15	Purus	71	61	69
13	MPUR 16.1	16	Purus	61	62	88
14	MPUR 16.7	16	Purus	0	0	66
15	MPUR 17.4	17	Purus	0	33	34
16	MPUR 17.5	17	Purus	0	0	0
17	MPUR 18.8	18	Purus	22	64	64
18	MPUR 26.1	26	Purus	45	59	53
19	MPUR 27.1	27	Purus	0	42	60
20	MPUR 27.5	27	Purus	67	80	83
21	MPUR 28.3	28	Purus	30	32	51
22	MPUR 28.6	28	Purus	29	50	51
23	MPUR 30.4	30	Purus	30	14	27
24	MPUR 33.1	33	Purus	72	56	83
25	MPUR 35.2	35	Purus	73	63	81
26	MPUR 36.2	36	Purus	77	62	82
27	MPUR 37.2	37	Purus	0	0	24
28	MPUR 39.1	39	Purus	63	15	30
29	MPUR 39.2	39	Purus	62	35	73
30	MPUR 39.4	39	Purus	0	0	25
31	MPUR 40.3	40	Purus	79	69	87

32	MPUR 40.4	40	Purus	52	66	61
33	MPUR 40.7	40	Purus	4	59	51
34	MPUR 42.5	42	Purus	0	0	30
35	MPUR 44.1	44	Purus	0	51	89
36	MPUR 46.7	46	Purus	87	80	89
37	MPUR 50.1	50	Purus	9	62	57
38	MPUR 51.6	51	Purus	86	72	90

Ao avaliar os resultados da inibição *in vitro* aqui obtidos, deve-se levar em consideração que os testes foram realizados em condições de cultivo favoráveis aos fitopatógenos (Figura 10). Isto indica que a eficiência na inibição do crescimento dos fitopatógenos pode ser potencializada por: i) estabelecimento das condições de cultivo que favoreçam a produção de metabólitos secundários (Barka et al., 2016; Grasso et al., 2016; Li et al., 2016; Wink et al., 2017); ii) indução de vias voltadas à produção de metabólitos que estão normalmente silenciadas em condições de laboratório e que se induzidas poderão potencializar a atividade antimicrobiana (Abdelmohsen et al., 2015; Wink et al., 2017).

A avaliação de inibição do crescimento *in vitro* é o primeiro passo para estabelecer possíveis tratamentos de doenças de plantas por meio de biocontrole, como demonstra Thampi e Bhai (2017) no biocontrole de *Phytophthora capsici* e *Sclerotium rolfsii* em pimenta do reino (*Piper nigrum* L) utilizando isolados de *Streptomyces*. Os resultados *in vitro* corresponderam a PIC de 91% (contra *P. capsici*) e 94% (contra *S. rolfsii*), e os testes *in planta* em condições de campo reduziram a incidência da doença em 80,87% (*P. capsici*) e até 98% (*S. rolfsii*), sendo mais eficiente inclusive do que o fungicida. Já Wonglom et al. (2019) relataram que o potencial inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. e *Curvularia lunata* foi de 75,6% e 69,5%, respectivamente, pelo *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2, a partir dos testes *in vitro*. Testes *in planta*, confirmaram a diminuição da severidade da doença.

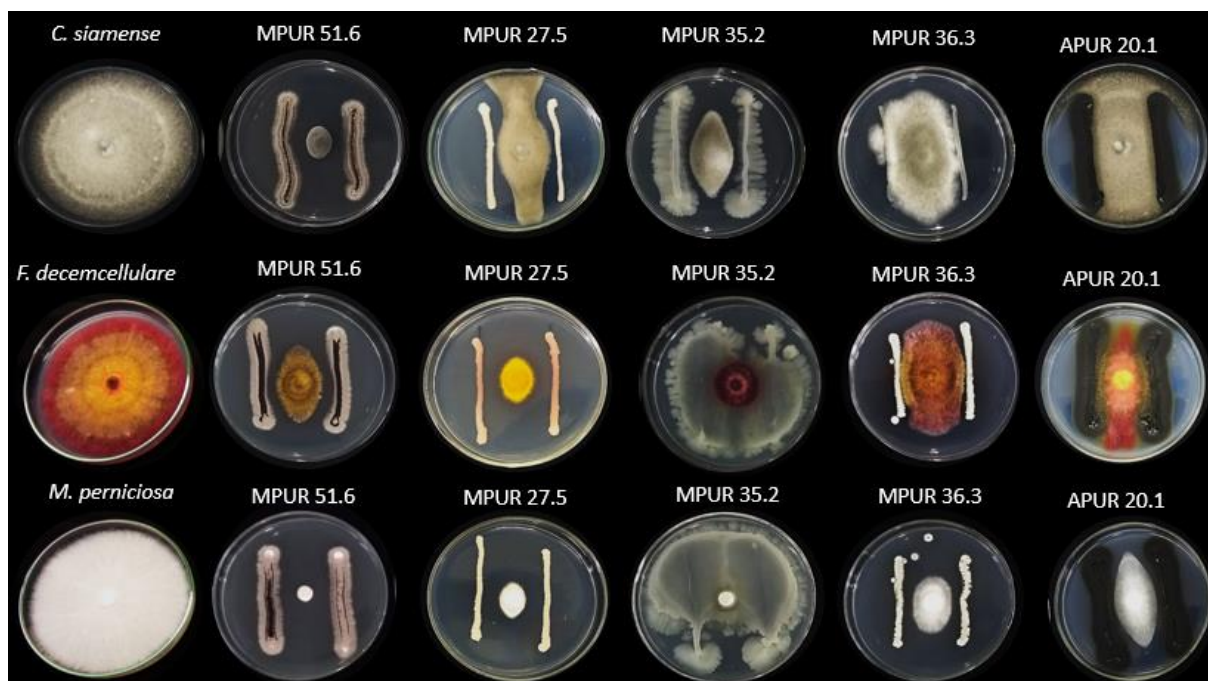


Figura 10. Antagonismo de bactérias isoladas dos rios Madeira e Purus aos fitopatógenos: *C. siamense*, *F. decemcellulare* e *M. pernicioso*.

Os isolados com melhor performance na inibição *in vitro* (Tabela 6) foram: AMAD 9.1 (PIC 75%), APUR 32.5 (PIC 79%), APUR 37.1 (PIC 83%), MPUR 16.1 (PIC 88%), MPUR 33.1 (PIC 83%), MPUR 35.2 (PIC 81%), MPUR 36.2 (PIC 82%), MPUR 39.2 (PIC 73%), MPUR 40.3 (PIC 87%), MPUR 44.1 (PIC 89%), MPUR 46.7 (PIC 89%) e MPUR 51.6 (PIC 90%). Estes dados indicam que estas bactérias que apresentam atividade antifúngicas são candidatas aos testes *in planta* que é o próximo passo para o desenvolvimento de agentes alternativos de biocontrole. Visto que, os patógenos *C. siamense*, *F. decemcellulare* e *M. pernicioso* são fungos que afetam diretamente culturas importantes economicamente para a região norte do Brasil, as soluções para o controle das doenças causadas por estes patógenos com base nas bactérias aqui analisados poderão ser no futuro parte de tecnologias ambientalmente sustentáveis.

4.3.1 Seleção de *Streptomyces* e *Bacillus* contra diferentes patógenos de importância agrícola

Baseado em suas atividades antagônicas, os isolados APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7, foram avaliados em relação a inibição de outros sete fitopatógenos distintos, sendo eles: *C. cassicola*, *C. guaranicola*, *C. spaethianum*, *P. fijiensis*, *N. formicarum*, *P. gilvanii* e *Rhizoctonia* sp.

O PIC variou de 14% a 89%, sendo a menor inibição realizada pelo isolado MPUR 46.7 contra *Rhizoctonia* sp. e as maiores foram dos isolados MPUR 40.3 e APUR 32.5 contra *C. guaranicola* (88%) e MPUR 40.3 e MPUR 46.7 contra *M. pernicioso* com 87 e 89%, respectivamente. (Figura 11 e 12).

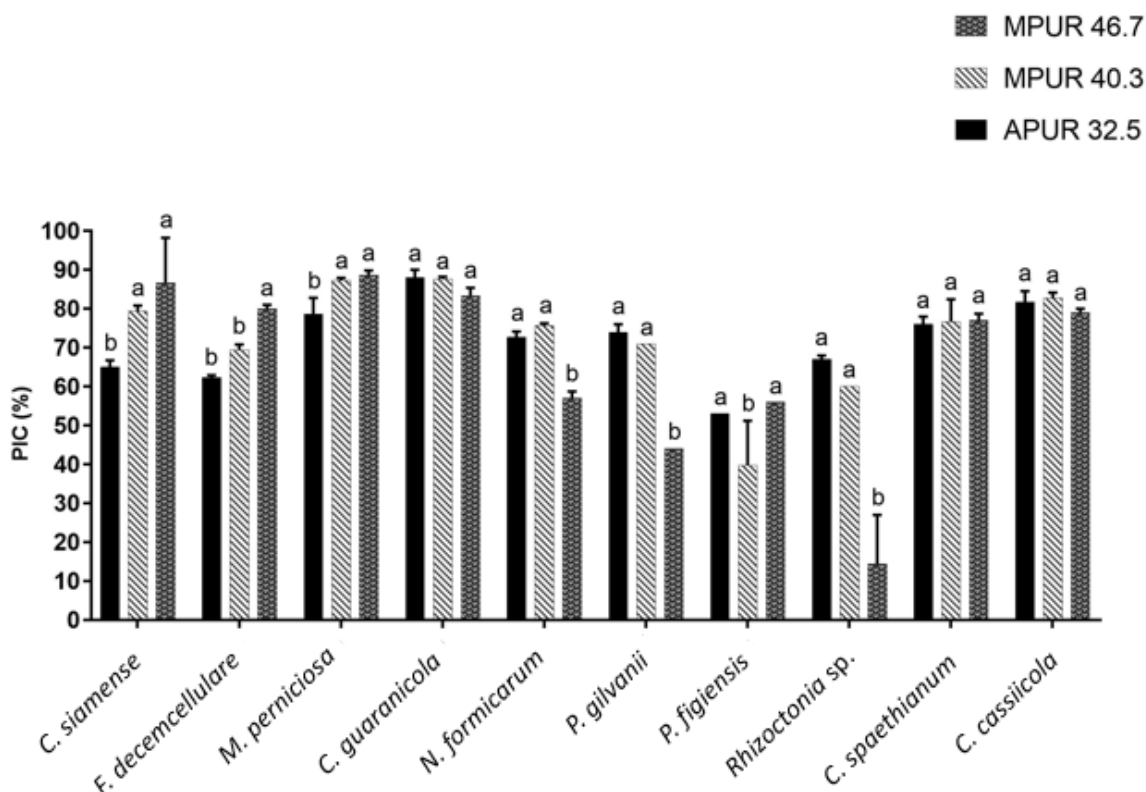


Figura 11. Índice de inibição de crescimento micelial (PIC) de fitopatógenos distintos por *Streptomyces* spp. (APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7). Letras iguais significa que não houve diferença significativa no PIC dos três isolados.

Os resultados aqui obtidos corroboram com a atividade antifúngica observada em outros estudos realizados com *Streptomyces*, como os realizados por Zhang et al. 2020, no qual a *Streptomyces badius* gz-8 apresentou atividade antagonista ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* com taxa de inibição de 72.5%. *Streptomyces* YYS-7 isolada da rizosfera de bananeira em área contaminada com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), agente causal de murcha, também apresentou atividade antifúngica com índice de inibição do crescimento micelial de 70% (Wei et al., 2020). Já a *Streptomyces albidoflevus* OsiLf-2 inibiu o crescimento micelial de diferentes linhagens de *Pyricularia oryzae* (*Magnaporthe oryzae*), agente causal do brusone, importante doença do arroz, onde pico de inibição variou de 74 a 83% (Gao et al., 2020).

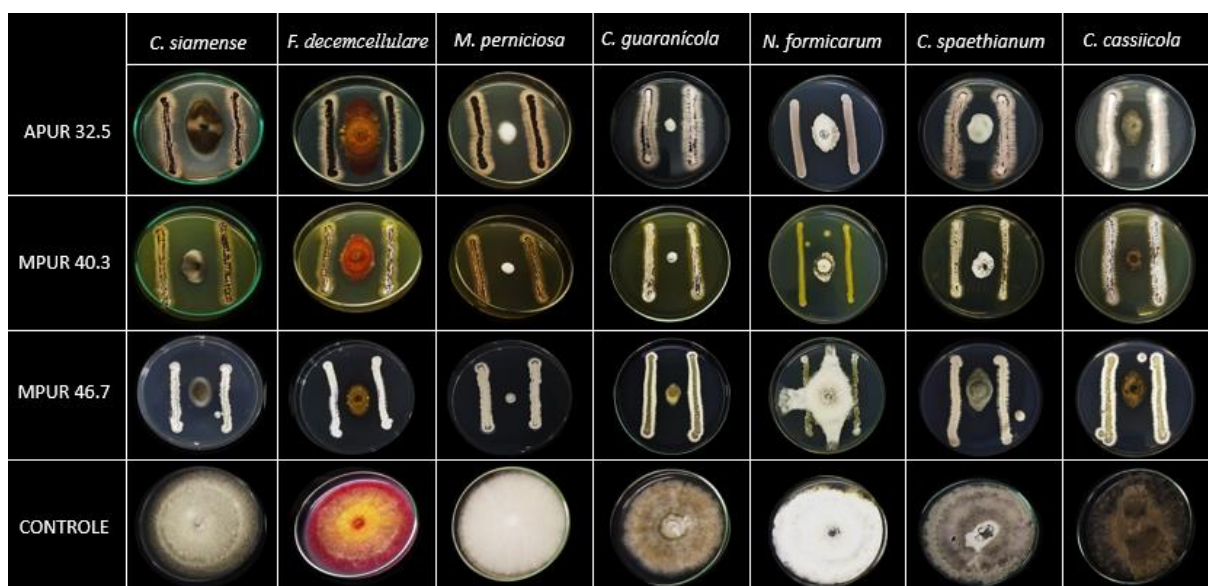


Figura 12. Antagonismo das bactérias APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 isoladas dos rios Madeira e Purus aos fitopatógenos.

Os isolados de *Bacillus* selecionados (MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1) foram avaliados quanto a atividade antagônica contra os fitopatógenos *P. gilvanii*, *Rhizoctonia* sp., *C. spaethianum* e *C. cassicola* (Figura 13), além dos três patógenos citados no item 4.2. O PIC variou de 12 a 89% para pelo menos um dos fitopatógenos testados. Os três isolados obtiveram maior PIC contra o fungo *M. pernicioso*, com índice de crescimento micelial de 81%, 83% e 89% para os respectivos isolados MPUR 35.2, MPUR 33.1 e MPUR 44.1. O isolado MPUR 44.1 não apresentou qualquer inibição contra *C. siamense*.

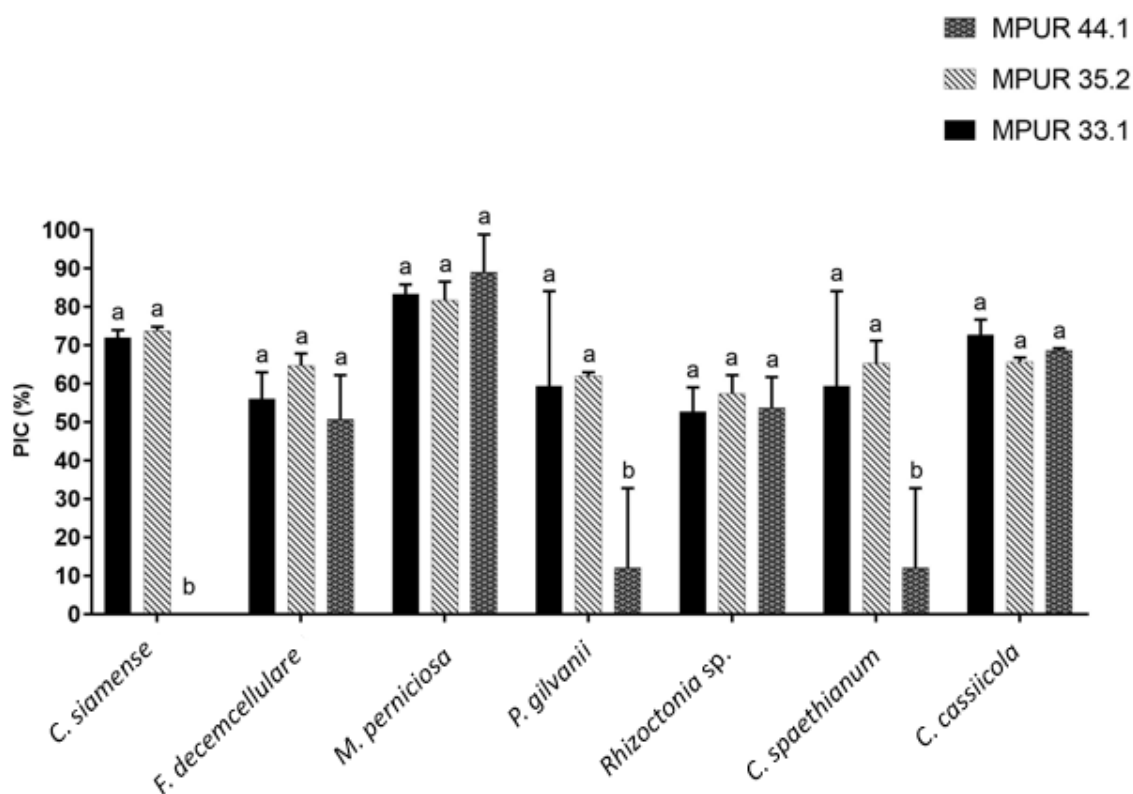


Figura 13. Índice de inibição de crescimento micelial (PIC) de fitopatógenos distintos por *Bacillus* spp. (MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1). Letras iguais significa que não houve diferença significativa no PIC dos três isolados.

Trabalhos realizados por Zohora et al. (2016) também mostraram a eficiência antagonista de *Bacillus subtilis* RB14 a *Rhizoctonia solani*, agente causal do tomateiro, com redução de 80% da doença. Nawaz et al. (2018) em seus estudos, observaram forte atividade antagonista em virtude da produção biosurfactantes liberado pela cepa *Bacillus licheniformis* OE-04 a *C. gossypii*, agente causal de antracnose em cultura de algodão. É importante salientar que a atividade antagonista pode acontecer em virtude de diversos fatores (Saxena et al. 2019), no caso do *Bacillus velezensis* ZSY-1, o antagonismo aconteceu pela ação dos compostos voláteis (VOC) liberados pela bactéria contra *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Valsa mali*, *Monilinia fructicola*, *Fusarium oxysporum f. sp. capsicum* e *Colletotrichum lindemuthianum* com inibição de 81,1%, 93,8%, 83,2%, 80,9%, 76,7% e 70,6%, respectivamente (Gao et al., 2017).

Neste trabalho, os resultados obtidos corroboram com estudos realizados com *Streptomyces* spp. e *Bacillus* spp. isolados de diversos ambientes, principalmente do solo. E os índices de inibição *in vitro* foram similares ou superiores aos descritos na literatura com

fitopatógenos distintos. Tal fato, ampara a necessidade dos testes *in planta* para verificar a viabilidade desses microrganismos no controle de doenças durante a interação patógeno hospedeiro e desta forma contribuir para o futuro desenvolvimento de um bioproduto/biofungicida que possa substituir os agrotóxicos de alto risco para população e meio ambiente.

Desde a década de 40 as actinobactérias se destacam pela capacidade de produzir metabólitos bioativos. Atualmente os estudos com esse grupo ainda são abundantes e os resultados continuam surpreendendo positivamente seja na medicina ou na agricultura (Atta, 2015; Barka et al., 2016; Wang e Jiang, 2016; Bubici, 2018; Dede et al., 2020; Wang et al., 2020). Da mesma forma, o gênero *Bacillus* apresentam espécies promissoras, principalmente para a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana (Fira et al., 2018).

4.4 Identificação Molecular

Dos 38 isolados selecionados para a produção de antifúngicos, 33 foram analisados com base na sequência da região 16S, sendo 28 identificados com sucesso. Destes, 15 são do gênero *Bacillus* e 12 são do gênero *Streptomyces*. Os isolados do gênero *Bacillus* pertencem a diferentes grupos: sendo quatro *B. cereus*, quatro *B. megaterium* e sete *B. subtilis* (Figura 14).

A taxonomia das espécie do gênero *Bacillus* é realizada por meio de análises morfológicas, bioquímicas, filogenômicas e genômicas (Bazinet, 2017; Liu et al., 2019; Dunlap, 2020; Rao et al., 2020). O gênero foi proposto por Cohn (1872) e atualmente compreende 406 espécies válidas segundo o LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) (<https://lpsn.dsmz.de/>). Membros dos grupos *B. subtilis* e *B. cereus* são determinados baseado no genoma completo (Bazinet, 2017; Liu et al., 2017; Dunlap, 2019; Carroll e Wiedmann, 2020).

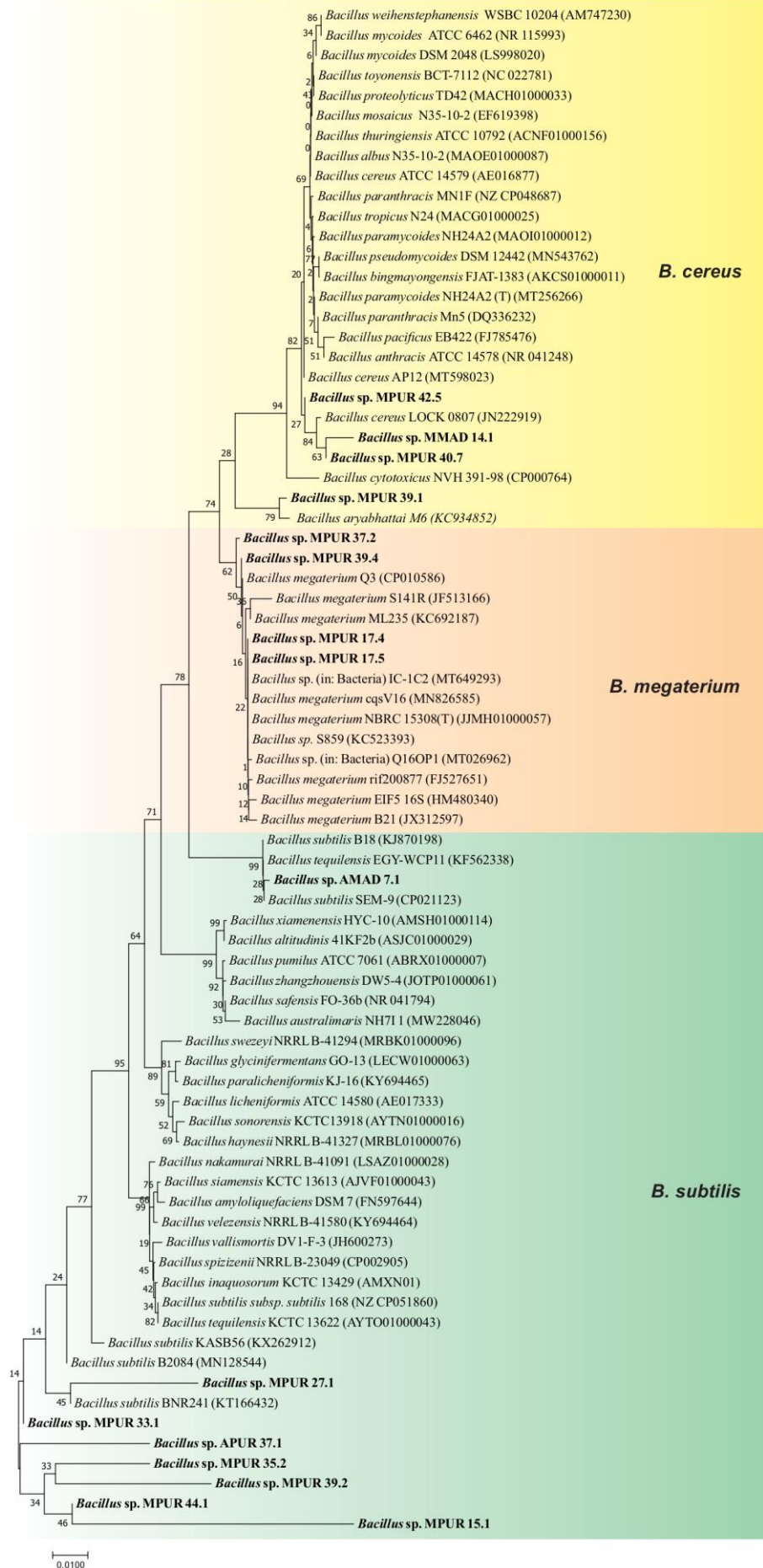


Figura 14. Árvore filogenética obtida pelo método *Neighbor-joining* a partir das sequências do gene 16S dos isolados e espécies intimamente relacionadas dentro do gênero *Bacillus*, disponível nos bancos de dados GenBank, EzBiocloud e DDJ (os números de acesso estão disponíveis entre parênteses). Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de bootstrap de 1000 repetições.

Devido aos depósitos de sequências identificadas incorretamente em bancos de dados públicos, a identificação desse grupo precisa de cautela, para desta forma, não “contribuir” com mais um dado equivocado (Rao et al., 2020). A reclassificação das informações já depositadas tem sido revistas frequentemente, numa tentativa de tornar os dados taxonômicos de *Bacillus* mais confiáveis, como é o caso de Rao et al. (2019) que reclassificou a espécie *Bacillus aryabhatai* DSM 21047T como sinônimo *Bacillus megaterium* DSM 32T, após avaliar a morfologia, bioquímica e o genoma, foram encontradas mais semelhanças do que divergências. Che et al. (2019), Liu et al. (2019), Dunlap (2020), Mullins et al. (2020) também realizaram trabalhos voltados pra reclassificação de espécies de *Bacillus* para corrigir as identificações errôneas dos bancos de dados.

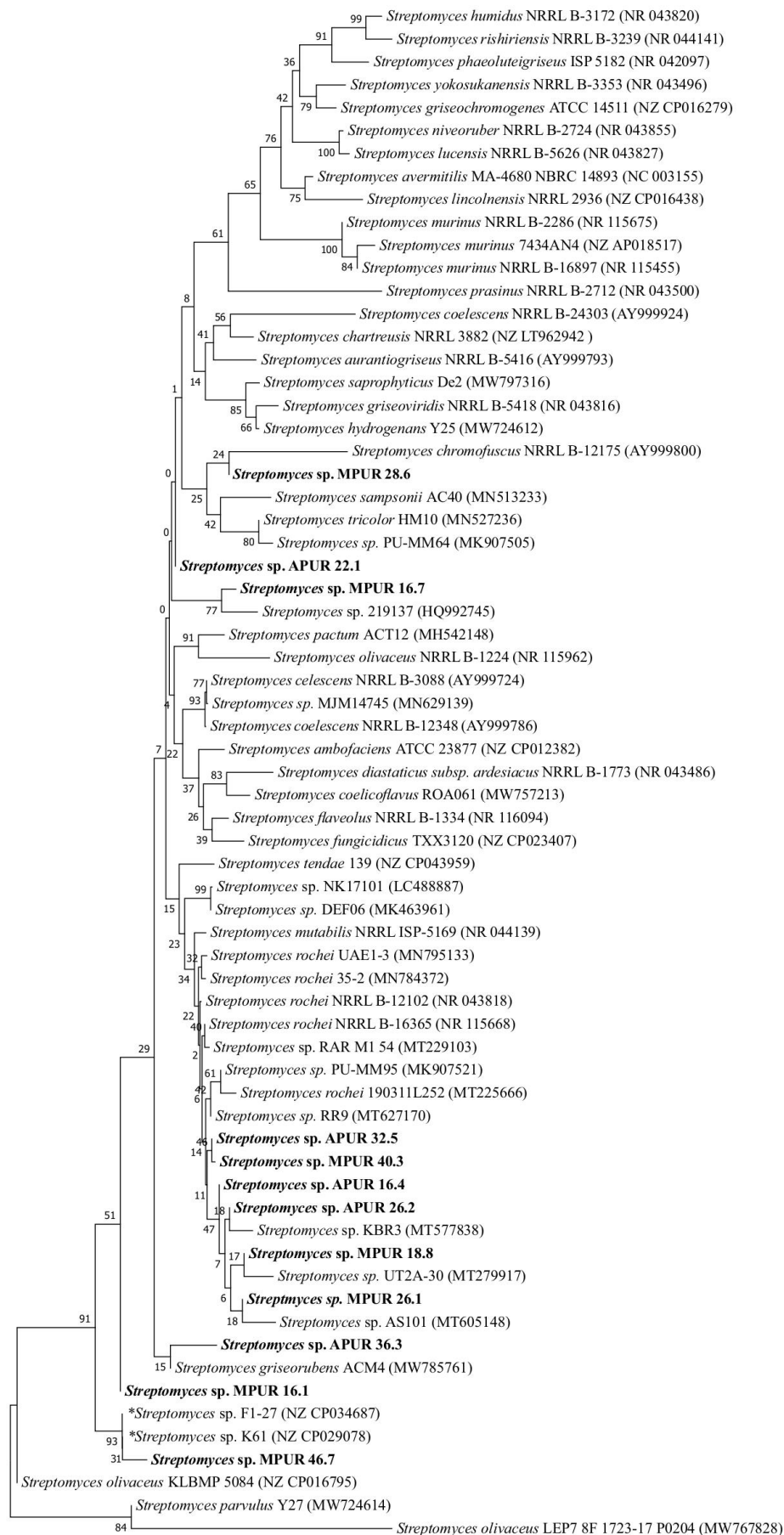
Neste trabalho a análise filogenética dos isolados com base na região 16S foi realizada com dados acurados e atualizados para evitar erros de identificação. Contudo, é importante salientar que para espécies do grupo *B. subtilis* e *B. cereus* a identificação é realizada com 350 e 2205 genes respectivamente (Dunlap, 2019), o que pressupõe a obtenção do genoma completo que além da taxonomia, permitem explorar principalmente o potencial biotecnológico relacionado à produção de metabólitos secundário de interesse agrônômico, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável.

No tocante, as 12 bactérias do filo Actinobacteria, todas são pertencentes ao gênero *Streptomyces*, que assim como a identificação taxonomica de *Bacillus*, infelizmente são encontradas muitas inconsistências e erros nos bancos de dados, principalmente quando se trata de identificação a nível de espécie (Labeda et al., 2017).

Neste trabalho para evitar erros, apenas sequências baseadas em trabalhos revisados foram utilizadas. A filogenia baseada em 16S indicou que seis isolados (APUR 32.5, MPUR 40.3, MPUR 18.8, MPUR 26.1, APUR 16.4 e APUR 26.2) estão proximamente relacionados a *S. rochei*; o isolado MPUR 28.6 a *S. chromofuscus*; o isolado MPUR 16.7 a *Streptomyces* sp. 219137; o isolado APUR 36.3 a *S. griseorubens* e o isolado MPUR 46.7 a *Streptomyces* sp. F1-27 e *Streptomyces* sp. K61 . Embora a região 16S seja muito conservada, dois isolados (APUR

22.1 e MPUR 16.1) não se agruparam com as espécies de referência utilizadas neste trabalho, indicando que estes isolados podem pertencer a espécies ainda não registradas ou que o dataset utilizado não apresentava as espécies tipos mais relacionadas com estes isolados. A região 16S devido a alta conservação apresenta baixa resolução filogenética quando se trata de espécies proximamente relacionadas. Entretanto, por ser utilizadas para identificar bactérias por pesquisadores de todo o mundo, e por constituir um grande banco de dados, a região permite a identificação pelo menos do gênero e uma inferência da linhagem mesmo que sem resolução espécies-específica, além das informações ecológicas e da distribuição territorial em termos globais com base na identidade das sequências (Ling et al., 2020). Como já mencionado, quando se refere a espécies intimamente relacionadas, a região 16S não consegue discriminar-las, colocando-as como mesma espécie, mesmo sendo distintas (Barka et al., 2016).

A identificação com precisão, requer a combinação de análises morfológicas, bioquímicas e filogenéticas baseadas em uma análise multilocus (MLST). No caso de *Streptomyces* para identificação, tem-se utilizados outros genes além do 16S, como *atpD* (ATP sintase F1, beta subunit), *gyrB* (DNA gyrase B subunit), *recA* (RNA polymerase beta subunit), *rpoB* (recombinase A) e *trpB* (tryptophan synthetase, beta subunit) (Lo Grasso et al., 2016; Law et al., 2018; Law et al., 2019; Zhang et al., 2020) conhecidos como genes constitutivos ou genes de manutenção (Barka et al., 2016; Law et al., 2018).



0,0100

Figura 15. Árvore filogenética obtida pelo método *Neighbor-joining* a partir das sequências da região 16S dos isolados e espécies intimamente relacionadas dentro do gênero *Streptomyces* disponível nos bancos de dados GenBank, EzBiocloud e DDJ (os números de acesso estão disponíveis entre parênteses) e confirmado com Labeda et al. (2017). Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de bootstrap de 1000 repetições.

4.4.1 Caracterização molecular dos isolados de *Streptomyces*

Os três isolados de *Streptomyces* (APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7) selecionado com base na avaliação *in vitro* da inibição de fitopatógenos, foram submetidos a inferência filogenética baseada na análise concatenada de três genes: 16S, *gyrB* e *trpB* (Figura 16). Para esta análise utilizou-se dados do NCBI, DDBJ e EzBioCloud validados por meio trabalhos científicos e reclassificação do gênero *Streptomyces* (Labeda et al., 2017).

A inferência utilizando os algoritmos *Neighbor Joining* (NJ) e *Maximum Likelihood* (ML) indicam que os isolados de *Streptomyces* APUR 32.5 e MPUR 46.7 podem ser duas possíveis novas espécies. No qual, a *Streptomyces* APUR 32.5 está mais relacionada com *S. rochei*, e o isolado MPUR 46.7 está proxicamente relacionado a *Streptomyces* sp. F1-27 e *Streptomyces* sp. K61 que embora tenham genoma completo estão erroneamente identificadas como *S. griseoviridis*. Já o isolado MPUR 40.3 agrupou com a espécie *Streptomyces albogriseolus* com base no NJ, com o algoritmo ML mostrou-se mais relacionado com *S. murinus*. Para a confirmação será necessária a análise de outros *barcodes*, como as sequências parciais dos genes *atpD*, *rpoB* e *recA*.

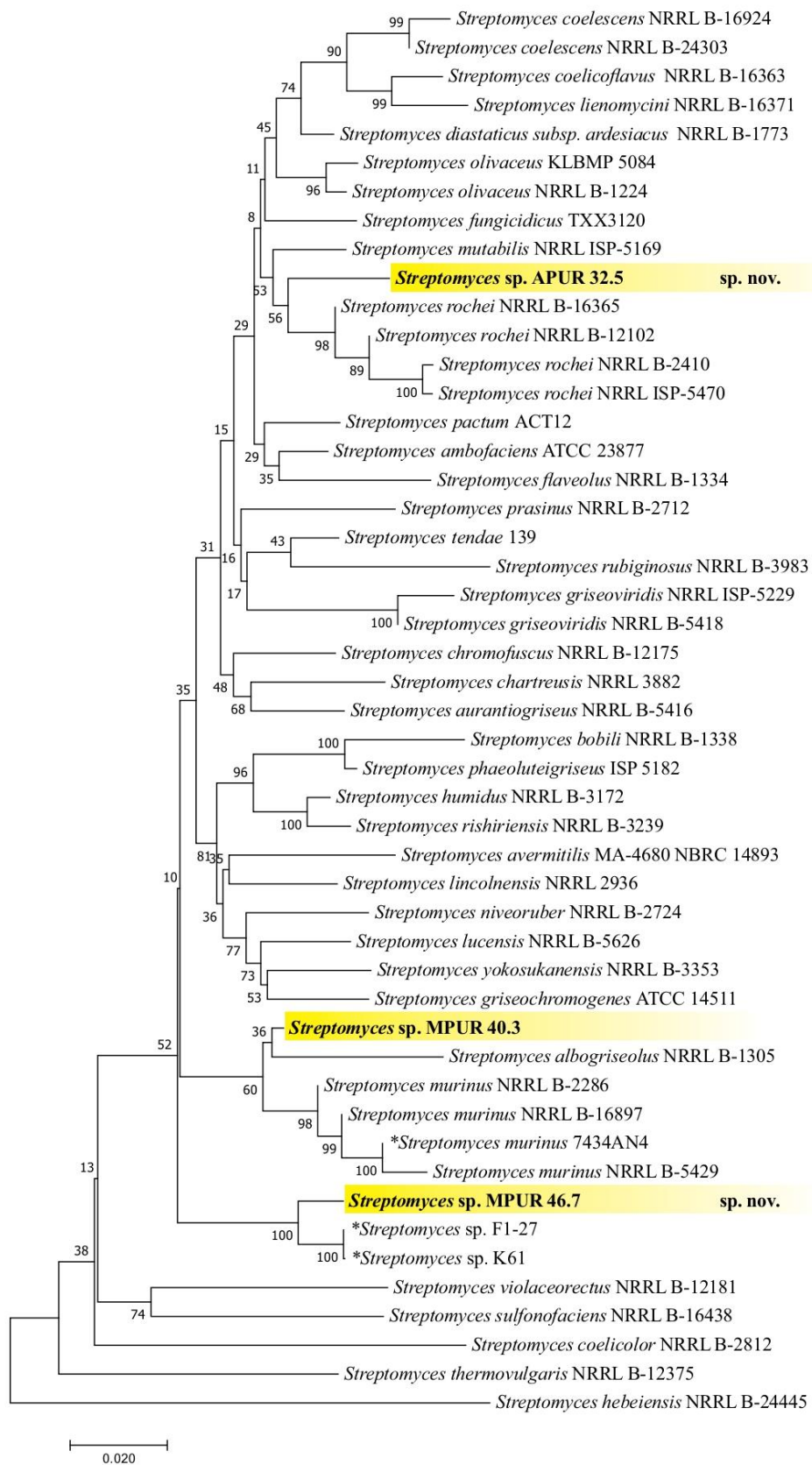


Figura 16. Análise filogenética dos isolados APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 e táxons relacionados baseada no método NJ (Neighbor Joining) a partir das sequências parciais concatenadas do 16S e genes *gyrB* e *trpB*. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com

base em análises de bootstrap de 1500 repetições. Os asteriscos indicam a sugestão de reclassificação de espécies depositadas com nomes não correspondentes a espécie de referência.

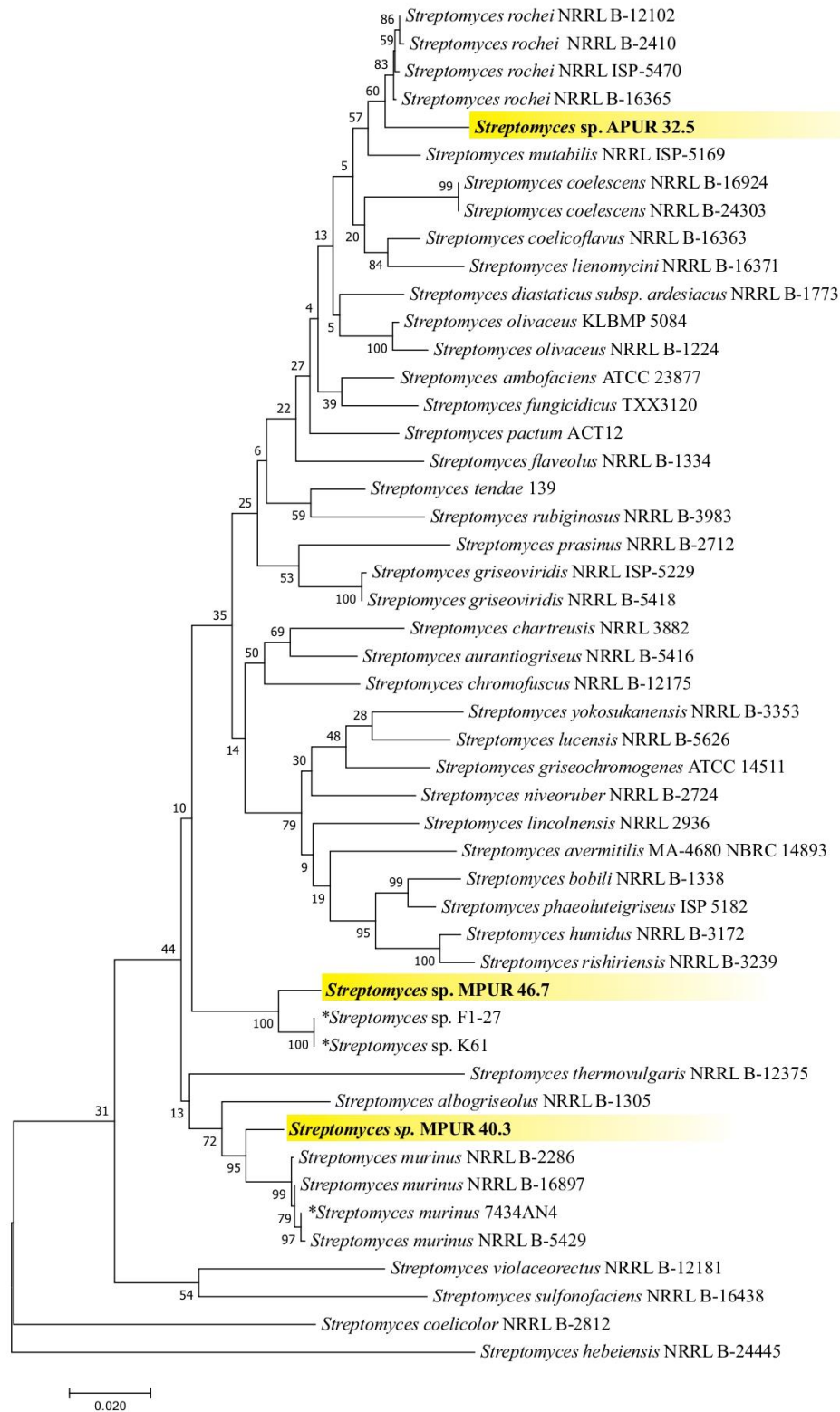


Figura 17. Análise filogenética dos isolados APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 e táxons relacionados com base no método da *Máxima Verossimilhança* (ML) baseada na análise das sequências parciais concatenada do 16S e genes *gyrB* e *trpB*. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos

agrupamentos com base em análises de bootstrap de 1500 repetições. Os asteriscos indicam a sugestão de reclassificação de espécies depositadas com nomes não correspondentes a espécie de referência.

4.4.2 Caracterização morfológica e fenotípica dos isolados de *Streptomyces* spp.

A análise dos isolados APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 quanto ao crescimento micelial, coloração de hifas aéreas, coloração dos micélios vegetativos e produção de pigmentos em onze meios de cultura distintos são apresentados na Tabela 7.

O isolado APUR 32.5 apresentou melhor crescimento nos meios ISP1, ISP2, SYEP e V8. Para o isolado MPUR 40.3, o melhor crescimento micelial foi observado em ISP1, ISP2, ACA, SYEP e V8. Para o isolado MPUR 46.7, o melhor crescimento foi nos meios ISP2, ISP3 e V8. A melhor temperatura de crescimento foi 30° C entre o 5° e 10° dia, após esse período notou-se a perda de coloração vibrante dos micélios, principalmente dos isolados APUR 32.5 e MPUR 40.3. Vale enfatizar que a produção de esporos e o crescimento de micélio aéreo estão relacionados com o meio de cultura, logo, o ISP2 foi o meio de cultura que apresentou melhor desenvolvimento de esporos (Shirling e Gottlieb, 1966).

Tabela 7. Caracterização morfológica dos isolados de *Streptomyces* APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7.

Cepa APUR 32.5				
Meio de cultura	Crescimento micelial/vegetativo	Coloração do Micélio aéreo	Coloração do micélio vegetativo	Pigmento no substrato
ISP1	Bom (++)	Branco	Cinza	-
ISP2	Bom (++)	Branco, marrom claro e marrom escuro	Marrom	-
ISP3	Moderado (+)	Marrom e branco	Marrom	-
LB	Baixo (-)	-	Marrom	-
ACA	Bom (++)	Marrom	Marrom	-
SYEP	Bom (++)	Branco, marrom, amarelo claro	Branco	Preto
V8	Bom (++)	Marrom e marrom escuro com pontos brancos nas extremidades	-	-
BDA	Moderado (+)	Marrom claro, marrom escuro com pontos brancos	Marrom	-
SNA	Baixo (-)	-	-	-
AA	Baixo (-)	-	-	-
AIA	Moderado (-)	Branco	Branco	-
Cepa MPUR 40.3				
ISP1	Bom (++)	Amarelo e lilás	Branco	Amarelo
ISP2	Bom (++)	Marrom com pontos amarelos no centro	Marrom	-

ISP3	Bom (++)	Marrom e com bordas brancas	Marrom	-
LB	Baixo (-)	-	Amarelo	Amarelo
ACA	Moderado (+)	Branco	Amarelo	Amarelo
SYEP	Bom (++)	marrom, branco nas bordas com pontos amarelo pelo meio	Marrom	Amarelo
V8	Moderado (+)	Marrom e branco com pontos amarelos e brancos	-	Amarelo
BDA	Baixo (-)	Marrom escuro, marrom claro e branco	Amarelo	Amarelo
SNA	Bom (++)	Marrom	Marrom	-
AA	Baixo (-)	-	-	-
AIA	Baixo (-)	-	-	-
Cepa MPUR 46.7				
ISP1	Baixo (-)	Branco	Branco	-
ISP2	Bom (++)	Branco	Branco	-
ISP3	Bom (++)	Branco	Branco	-
LB	Moderado (+)	Branco	Branco	-
ACA	Bom (++)	Branco	Branco	-
SYEP	Moderado (+)	Branco	Branco	-
V8	Moderado (+)	Salmão/rosa e branco	-	-
BDA	Moderado (+)	Branco	Branco	-
SNA	Baixo (-)	Branco	Branco	-
AA	Baixo (-)	-	-	-
AIA	Baixo (-)	-	-	-

(++) = crescimento vegetativo e micelial ao longo de toda a estria; (+) = crescimento vegetativo e micelial com menor intensidade; (-) = somente crescimento vegetativo

A produção de pigmentos foi observada no isolado MPUR 40.3 que secretou pigmento amarelo em seis dos onze meios de cultura, já o APUR 32.5 apresentou pigmento preto, quando crescido em SYEP. A coloração dos micélios aéreos variou de acordo com a fonte de carbono, como demonstrado na figura 18. A pigmentação pode ser um dos indicativos de compostos antimicrobianos para o isolado APUR 32.5 e MPUR 40.3 (Law et al., 2018).

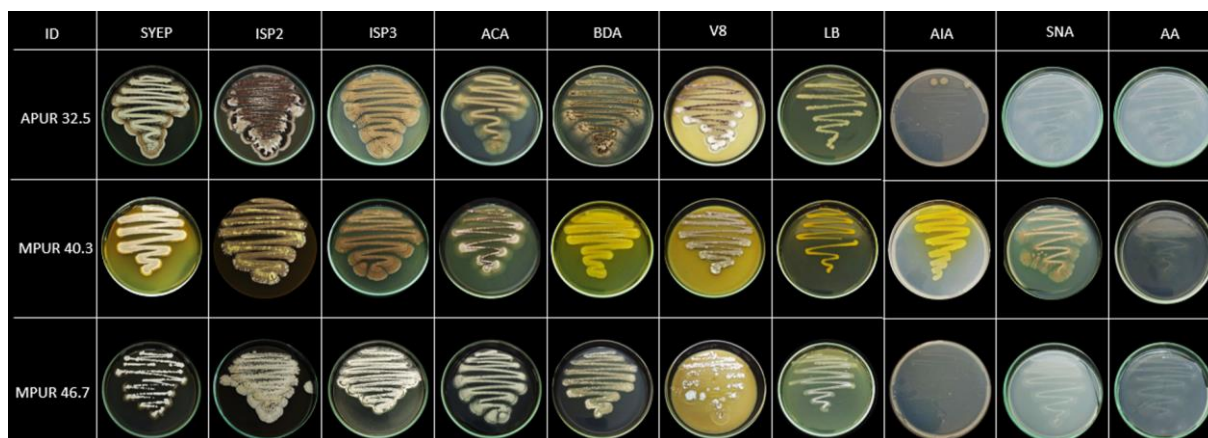


Figura 18. Características morfológicas dos isolados APUR 32.2, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 de *Streptomyces* em diferentes meios de cultura.

Quanto às características morfológicas, os micélios aéreos apresentaram longas cadeias de esporos retos, e esses esporos apresentam características cúbicas enrugadas, típicas do gênero *Streptomyces* (Figura 19). Shirling e Gottlieb (1966) descreveram quatro formas distintas de esporos, sendo elas: lisas, espinhosas, peludas e enrugadas. Os mesmos ainda enfatizam que as culturas que sofrem autólise, propriedades higroscópicas ou desidratação podem mudar sua morfologia.

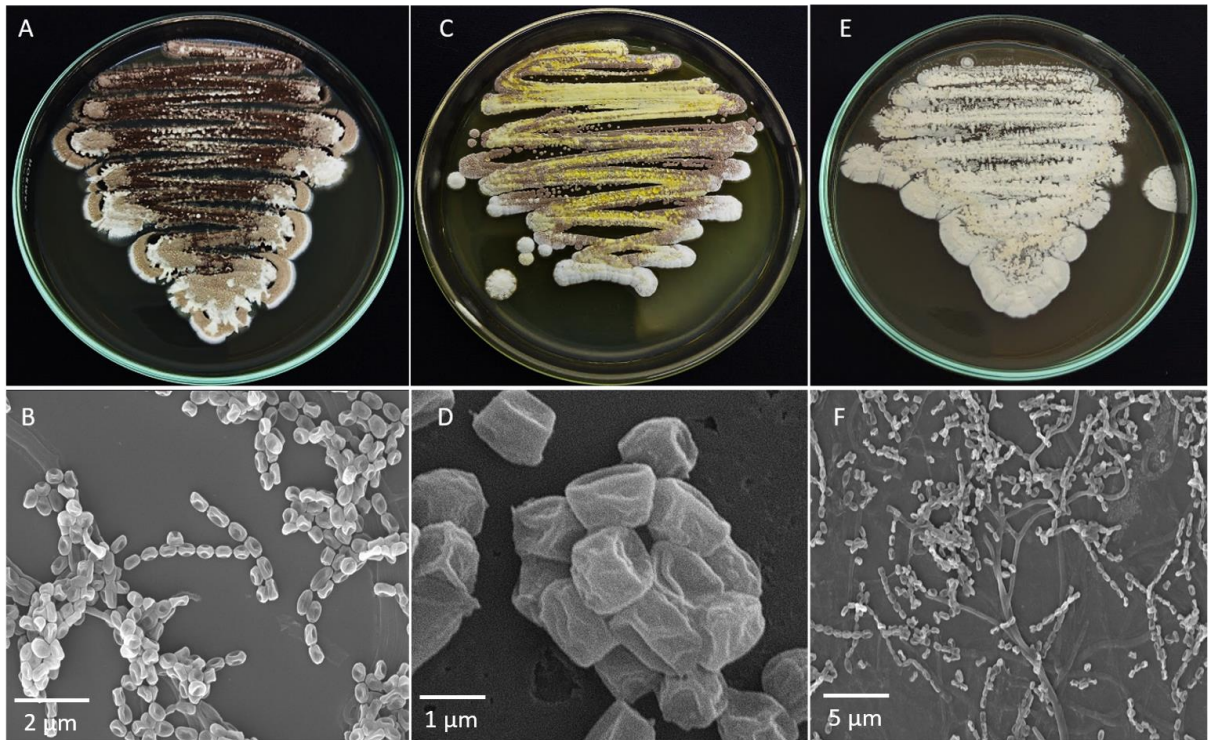


Figura 19. Produção de micélio aéreo em meio ISP2 e Microscopia Eletrônica de Varredura de *Streptomyces* spp. isolados do rio Purus. A e B- isolado APUR 32.5; B; C e D- isolado MPUR 40.3; E e F- isolado MPUR 46.7. Escala de ampliação: B- 2µm; D- 1µm; F- 5µm.

4.4.3 Avaliação da tolerância a temperatura e pH dos isolados de *Streptomyces*

A tolerância a temperaturas variando de 25 a 50° C e pH de 6 a 8 foi também avaliada (Tabela 8). O isolado APUR 32.5 identificado como uma nova espécie de *Streptomyces* cresceu bem à 35° C em pH 6, 7 e 8 e em 40°C em pH 6. O isolado *Streptomyces* sp. MPUR 40.3 apresentou crescimento vigoroso nas temperaturas: 25° C em pH 8; 30° C em pH 7 e 8; 35°C em todos os pH testados. O isolado *Streptomyces* sp. MPUR 46.7 cresceu bem a 25 e 30° C em pH 8.

Tabela 8. Crescimento em diferentes temperaturas e pHs dos isolados de *Streptomyces* APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7.

°C	pH	APUR 32.5	MPUR 40.3	MPUR 46.7
25	6	++	++	+
	7	++	++	+
	8	++	+++	+++
30	6	++	++	+
	7	++	+++	+
	8	++	+++	+++
35	6	+++	+++	+
	7	+++	+++	+
	8	+++	+++	+
40	6	+++	++	-
	7	++	++	-
	8	++	++	-
45	6	+	+	-
	7	+	+	-
	8	+	+	-
50	6	-	-	-
	7	-	-	-
	8	-	-	-

(+++) crescimento ótimo; (++) crescimento moderado; (+) crescimento baixo; (-) ausência de crescimento.

A tolerância a temperatura e pH é um fator importante para verificar a viabilidade das condições de crescimento desses microrganismos, conseqüentemente fundamental para o desenvolvimento de futuros bioinoculantes, considerando as condições ambientais de cada região. Jin e colaboradores (2019) ao analisarem o crescimento da *Streptomyces inhibens* sp. nov. verificaram que a mesma conseguiu crescer nas temperaturas entre 15 a 37 °C com pH de 5 a 9. Já os resultados de Yu et al. (2020) demonstraram que a *Streptomyces triticiradicis* sp. nov. cresceu na temperatura de 4 a 40 °C e pH de 5 a 10. Essa linhagem ainda apresentou atividade antifúngica e a análise do genoma demonstrou diversos potenciais BGCs (*Biosynthetic gene clusters*) e um dos *clusters* com 63% de similaridade com o *cluster* relacionado a biossíntese do antifúngico natamicina. É importante salientar que a relação ecológica entre microrganismos de solo e plantas abrange diversas funções, como promoção de crescimento e proteção da planta por meio da produção de antimicrobianos e inseticidas naturais, estabelecendo uma simbiose entre ambos (Vurukonda et al., 2018). Então quanto mais

soubermos sobre a capacidade de adaptação desses microrganismos, melhor e mais aproveitável será a possibilidade de explorar os mesmos.

4.4.4 Concentração Mínima Inibitório (MIC)

Com base em dez fitopatógenos avaliados, apenas *M. pernicioso* foi sensível ao extrato até a menor dose testada de 10 ppm, com 100% de inibição, e os demais foram resistentes (Tabela 09). A ação fungicida foi confirmada por meio da observação de todas as concentrações testadas em placa de petri.

Observou-se ainda que o extrato do isolado MPUR 40.3 na concentração de 1000 e 500 ppm diminuiu o crescimento do *C. guaranicola* e *P. fijiensis* e o extrato do isolado MPUR 46.7 também diminuiu o crescimento micelial do fitopatógeno *P. fijiensis* também na concentração de 1000 e 500 ppm, quando comparados com o controle. Logo, os extratos demonstraram possuir atividade fungistática. O MIC por meio da técnica de difusão em disco torna-se necessária para verificar a percentagem de inibição dos referidos resultados.

Tabela 9. Concentração Mínima Inibitória de extratos dos isolados APUR 32.5; MPUR 40.3 e MPUR 46.7 contra diferentes fitopatógenos.

Isolados	Fitopatógenos	Concentração dos extratos (ppm)					
		1000	500	250	100	50	10
APUR 32.5	<i>Colletotrichum siamense</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>F. decemcellulare</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>M. pernicioso</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>N. fornicarum</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>P. gilvanii</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>P. fijiensis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. guaranicola</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. spaethianum</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. cassiicola</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Rhizoctonia sp.</i>	-	-	-	-	-	-
MPUR 40.3	<i>Colletotrichum siamense</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>F. decemcellulare</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>M. pernicioso</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>N. fornicarum</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>P. gilvanii</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>P. fijiensis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. guaranicola</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. spaethianum.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. cassiicola</i>	-	-	-	-	-	-	

MPUR 46.7	<i>Rhizoctonia sp.</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Colletotrichum siamense</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>F. decemcellulare</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>M. pernicioso</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>N. fornicarum</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>P. gilvanii</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>P. fijiensis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. guaranicola</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. spaethianum</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. cassicola</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	

(+) com inibição; (-) sem inibição

Os extratos também foram testados contra os patógenos humanos *C. albicans*, *S. aureus* e *B. cereus*. Desses, apenas o extrato do isolado MPUR 40.3 apresentou atividade contra o patógeno *B. cereus* até a concentração de 50 ppm (Tabela 10). A ação bactericida foi confirmada em placa de petri.

Tabela 10. Susceptibilidade antimicrobiana de extratos de *Streptomyces* contra patógenos humanos.

Isolados	Fitopatógenos	Concentração dos extratos (ppm)					
		1000	500	250	100	50	10
APUR 32.5	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-
MPUR 40.3	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-
MPUR 46.7	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-

(+) com inibição; (-) sem inibição

Contudo, quando os isolados foram testados diretamente contra os patógenos, o isolado APUR 32.5 apresentou halo de inibição de *C. albicans* e MPUR 40.3 inibiu os três patógenos testados. Todavia, o isolado MPUR 46.7 não inibiu os três patógenos testados (Tabela 11).

Tabela 11. Análise qualitativa de sensibilidade antimicrobiana dos isolados APUR 32.5; MPUR 40.3 e MPUR 46.7.

Isolados	Patógeno		
	<i>C. albicans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>

APUR 32.5	+	-	-
MPUR 40.3	+	+	+
MPUR 46.7	-	-	-

(+) halos ≥ 8 mm; (-) ausência de halo

Considerando que os extratos foram obtidos a partir de AcoEt, sendo este um solvente de média polaridade, o número de metabolitos ativos extraídos pode ter sido reduzido. Assim, para ampliar o número de diferentes metabólitos torna-se necessário testar diferentes solventes e condições de cultivo, utilizando a técnica de OSMAC. A obtenção de maior número de moléculas pode permitir a detecção de novos antimicrobianos.

Com isto, considerando o alto potencial de metabólitos secundários de *Streptomyces* spp., e a grande variabilidade de antibióticos descobertos até o momento (Manteca e Yagüe, 2018; Quinn et al., 2020), os resultados destes testes iniciais mostram a capacidade de metabólitos bioativos contra patógenos resistentes a medicamentos (Sengupta et al., 2015), visto que este é uma das maiores problemáticas na área da saúde e agricultura (Farraj et al., 2019). Contudo, estudos com amplo espectro, com intuito de expressar a diversidade metabólica precisam ser realizados, como demonstrou Manteca e Yagüe (2018) e Farraj et al. (2019).

4.4.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As três frações mostraram perfis cromatográficos semelhantes nos diferentes comprimentos de onda analisados (254, 366 nm), sendo visualizadas várias bandas de Rf's distintas nessas frações.

O melhor sistema utilizado para eluição da fração 1 e 2, foi AcoEt/MetOH 9:1, pois observou-se uma melhor separação dos constituintes. Na fração 1 foi possível visualizar apenas uma banda com Rf: 0,14 no comprimento de onda 366. (Figura 20).

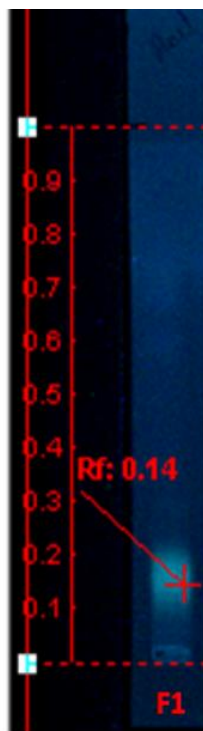


Figura 20. Fração 1 / APUR 32.5: Acetato de etila/Metanol 9:1; UV 366

No perfil cromatográfico da fração 2, foi possível observar uma substância de cor amarela nos Rf: 0,53 na luz visível, e um Rf semelhante foi possível ser observado no comprimento de onda 254 nm. Já no 366 nm apresentou substâncias nos Rfs 0,15, 0,30 e 0,53 (Figura 21).

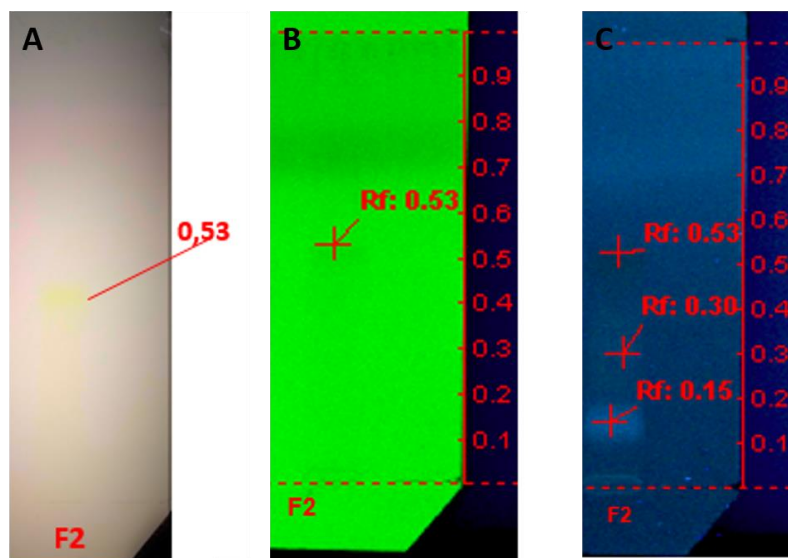


Figura 21. Fração 2 / MPUR 40.3: Acetato/ Metanol 9:1- (A) Luz visível; (B)UV 254 nm; (C)UV 366

nm.

Na fração 4 observou-se três substâncias nos Rfs: 0,34, 0,61, 0,71 nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm. O melhor sistema utilizado para eluição desta fração acetato de etila/hexano 9,5:0,5.

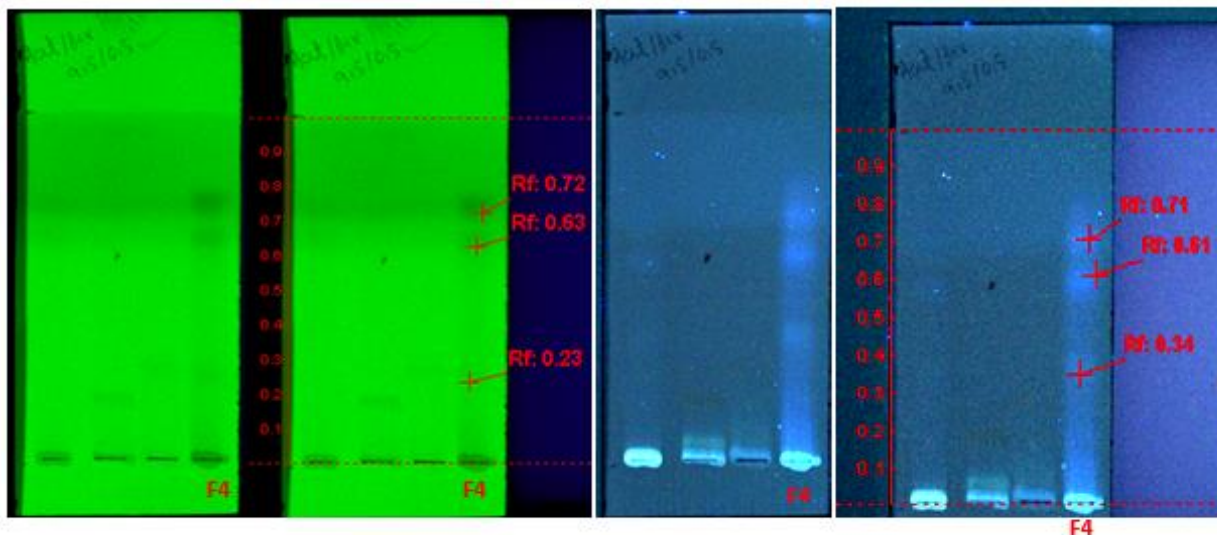


Figura 22. Fração 4 / MPUR 46.7: Acetato/ Hexano 9,5:0,5 - 254 nm/366 nm.

A cromatografia em camada delgada teve como intuito analisar o melhor solvente para eluição dos compostos, e desta forma, dar continuidade a identificação dos metabólitos expressos por meio do HPLC. É importante salientar que a extração apenas com acetato de etila diminui a diversidade metabólica que os microrganismos podem expressar, contudo, solventes com polaridade distintas como: metanol, hexano, clorofórmio podem aumentar a extração metabólica e até permitir a identificação de novos compostos bioativos.

Este ensaio é o começo de um importante passo para identificação de moléculas microbianas bioativas, visto que a necessidade por novos compostos para tratamentos contra microrganismos patogênicos resistentes e multirresistentes aumenta a cada dia, seja na agricultura, seja na área médica/farmacêutica (Bérdy, 2005; Procópio et al., 2012; Bubici, 2018; Manteca e Yagüe, 2018; Nakashima, 2018; Palla et al., 2018; Mast e Stegmann, 2019; Quinn et al., 2020; Salwan et al., 2020; Wenzel, 2020).

4.4.6 Atividade enzimática dos isolados de *Streptomyces* APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7

Os três isolados apresentaram atividade hidrolítica para amilase, celulase e protease. APUR 32.5 obteve os melhores IE=16±3,46 e 10±2,36 para amilase e lipase, respectivamente. A maior produção de amilase (IE=19±0,00) foi observada no isolado MPUR 40.3 que também

produz celulase IE $5,9 \pm 1,18$ e lipase IE $5,8 \pm 0,7$. Já MPUR 46.7 obteve IE = $7,7 \pm 0,19$ para amilase e $7,8 \pm 0,29$ para protease, e nenhuma atividade para lipase em qualquer condição (Figura 18).

Os resultados aqui apresentados mostraram-se superiores aos testes preliminares realizados por Shaik et al. (2017) e Singh et al. (2018) avaliados com $IE \leq 5$. Os testes quantitativos tornam-se necessários para validar os resultados.

Espécies de bactérias e fungos podem produzir uma ampla diversidade de enzimas hidrolíticas, como: amilase, celulase, lipase, protease, quitinase, pectinase e xilanase, entre outras (Valdés Ramírez e Calzadiaz, 2016; Liu e Kokare, 2017; Mukhtar et al., 2017; Gunasinghe e Edirisinghe, 2020). As enzimas tem aplicação em diversas áreas comerciais, como por exemplo, indústrias alimentícias, têxtil, farmacêutica, agrícola e demais (Mukhtar et al., 2017; Gunasinghe e Edirisinghe, 2020).

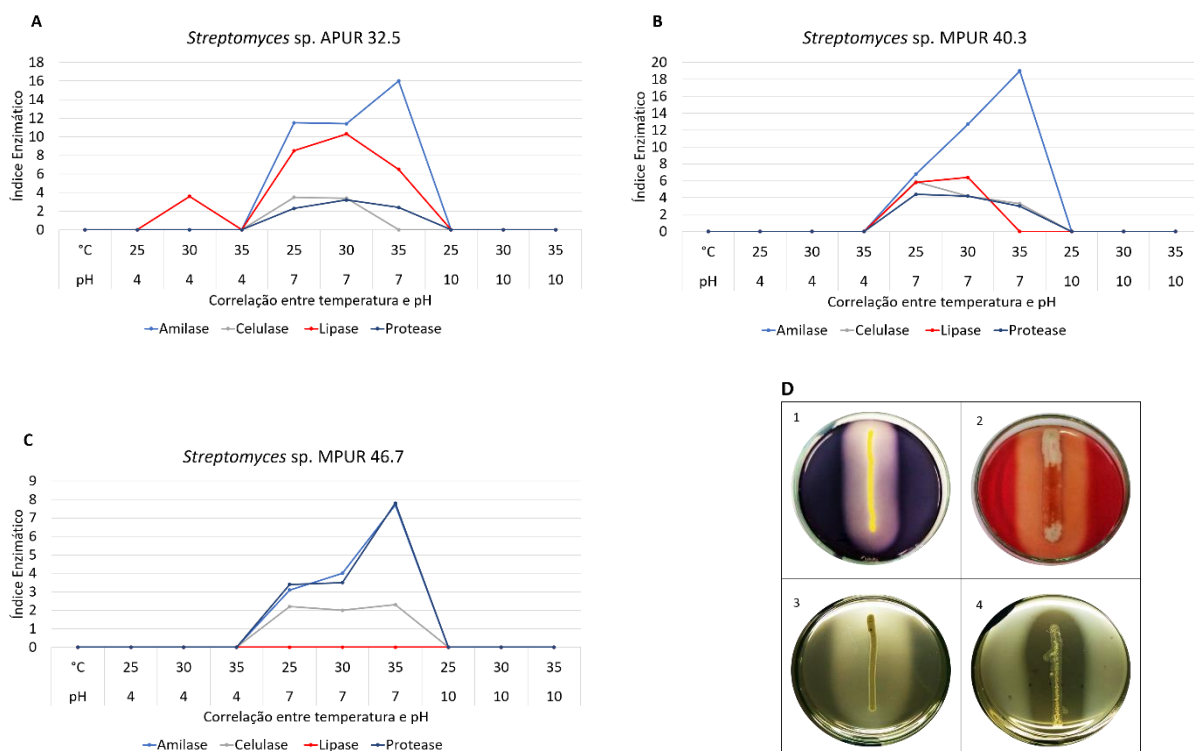


Figura 23. Índice Enzimático (IE) dos isolados de *Streptomyces* em temperaturas e pH distintos. **A.** Gráfico demonstrando os IE do *Streptomyces* sp. APUR 32.5. **B.** Gráfico com os IE do *Streptomyces* sp. MPUR 40.3. **C.** Gráfico com os IE do *Streptomyces* sp. MPUR 46.7. **D.** demonstração dos halos de degradação enzimática. 1. Amilase - *Streptomyces* sp. MPUR 40.3. 2. Celulase - *Streptomyces* sp. APUR 32.5. 3. Lipase - *Streptomyces* sp. APUR 32.5. 4. Protease - *Streptomyces* sp. MPUR 46.7.

Em busca de um mundo mais sustentável, com intuito de diminuir os insumos químicos consumidos em todo o mundo, há uma crescente demanda por processos biotecnológicos, utilizando microrganismos como principal recurso (Bhardwaj et al., 2017).

As enzimas são produzidas usando plataformas já definidas como *E. coli* e *S. subtilis*, contudo, Sevillano et al. (2016) mostrou que *S. lividans* pode também ser hospedeiras eficientes para produção de enzimas ativas. Com isso, as actinobactérias, mais especificamente o gênero *Streptomyces*, além da produção de antibióticos, são consideradas fonte de inúmeras enzimas importantes para diversas indústrias (Harir et al., 2018; González et al., 2020; Gunasinghe e Edirisinghe, 2020).

Observou-se neste experimento que os três isolados de *Streptomyces* avaliados, são bons produtores de enzimas com alto potencial biotecnológico. É importante salientar que protease e amilase são as enzimas mais comercializadas mundialmente, e com a utilização das tecnologias ômicas, a otimização da produção pode aumentar exponencialmente (Liu e Kokare, 2017). Estes isolados obtidas do rio Purus, além da atividade antifúngica mostraram-se também ter potencial para a produção de protease, amilase, celulase e lipase. Actinobactérias isoladas de diferentes ambientes como solo, sedimentos de mangue e sedimentos marinhos ao redor do mundo também tem revelado serem bons produtores de enzimas (Gunasinghe e Edirisinghe, 2020; Swarna e Gnanadoss, 2020; González et al., 2020).

Conclusão

Foram isoladas 220 bactérias de sedimentos dos rios Madeira e Purus. Esses microrganismos aqui analisados mostraram-se capazes de produzir antimicrobianos contra patógenos de importância agrícola e saúde humana. A identificação molecular com base na região 16S, caracterizou os isolados que apresentaram potencial antifúngico em dois gêneros: *Bacillus* e *Streptomyces*. Análise concatenada com as sequências da região 16S e dos genes *gyrB* e *trpB* indicou que os isolados APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 podem ser novas espécies. Os três isolados identificados como *Streptomyces* spp. ainda apresentaram atividade enzimática para amilase, celulase, lipase e protease. Os isolados MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1 identificados como *Bacillus* spp. também mostraram ótimo desempenho na inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos testados.

Perspectivas

É importante salientar que este, foi um estudo prévio sobre a potencialidade antimicrobiana e enzimática dos microrganismos mencionados acima. Logo, uma abordagem mais profunda torna-se necessária.

Os isolados *Streptomyces* APUR 32.5, MPUR 40.3 e MPUR 46.7 precisam ser confirmados como potenciais novas espécies por meio da análise de outros genes como *atpD*, *repoB* e *recA* ou mesmo o genoma completo, para uma prova inequívoca da descrição.

A descoberta de novos microrganismos, pode ser a porta de entrada para descoberta de novos metabólitos bioativos podendo ser usado na agricultura e medicina, considerando que a resistência microbiana é umas das problemáticas que só aumenta com o tempo, impossibilitando os tratamentos contra doenças que levam muitas pessoas à óbito.

O uso futuro dos isolados de *Streptomyces* analisados neste trabalho principalmente as possíveis novas espécies deve ser considerado, visto que este gênero constituem o maior grupo bacteriano, capaz de sintetizar metabólitos bioativos, seja antifúngico ou antibacteriano, e até o momento há poucos relatos de espécies patogênicas a humanos ou animais, deste modo, são fortes candidatos ao uso no controle biológico e na prospecção de novas moléculas, podendo desta forma, diminuir o uso de agrotóxicos que nos últimos anos aumenta absurdamente no Brasil.

REFERÊNCIAS

- Abdelmohsen, U.R.; Grkovic, T.; Balasubramanian, S.; Kamel, M.S.; Quinn, R.J.; Hentschel, U. 2015. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances* 33: 798–811.
- Ali, N.; Ullah, N.; Qasim, M.; Rahman, H. 2016. Molecular characterization and growth optimization of halo - tolerant protease producing *Bacillus Subtilis* Strain BLK - 1 . 5 isolated from salt mines of Karak , Pakistan. *Extremophiles* 20: 395–402.
- Antonelli, A.; Zizka, A.; Carvalho, F.A.; Scharn, R.; Bacon, C.D.; Silvestro, D.; et al. 2018. Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: 6034–6039.
- Atta, H.M. 2015. Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society* 19: 12–22.
- Ayed, A.; Slama, N.; Mankai, H.; Bachkouel, S.; ElKahoui, S.; Tabbene, O.; et al. 2018. *Streptomyces tunisialbus* sp. nov., a novel *Streptomyces* species with antimicrobial activity. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 111: 1571–1581.
- Barka, E.A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H.-P.; et al. 2016a. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of. *American Society for Microbiology* 80: 1–43.
- Barka, E.A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Nathalie Gaveau-Vaillant, C.J.; Klenk, H.-P.; Clément, C.; et al. 2016b. Taxonomy, Physiology *American Society for Microbiology* 80: 1–43.
- Barlow, J.; França, F.; Gardner, T.A.; Hicks, C.C.; Lennox, G.D.; Berenguer, E.; et al. 2018. The future of hyperdiverse tropical ecosystems. *Nature* 559: 517–526.
- Bashan, Y.; De-Bashan, L.E.; Prabhu, S.R.; Hernandez, J.-P. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology : formulations and practical perspectives. *Plant Soil* 1886: 1–33.
- Bazinet, A.L. 2017. Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *BMC Evolutionary Biology*: 1–16.
- Bérdy, J. 2005. Review Article. *J.Antibiot* 58: 1–26.
- Berini, F.; Katz, C.; Gruzdev, N.; Casartelli, M.; Tettamanti, G.; Marinelli, F. 2018. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology Advances* 36: 818–838.
- Bhardwaj, V.; Degrassi, G.; Bhardwaj, R.K. 2017. Microbial Pectinases and their applications in industries : A review. : 829–836.
- Bhatti, A.A.; Haq, S.; Bhat, R.A. 2017. Microbial Pathogenesis Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis* 111: 458–467.
- Borriss, R.; Wu, H.; Gao, X. 2019. Secondary Metabolites of the Plant Growth Promoting Model Rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 Are Involved in Direct Suppression of Plant Pathogens and in Stimulation of Plant-Induced Systemic Resistance. In: Singh, HB , Keswani, C. , Reddy, MS , Sansinenea, E. e G.-E. (Ed.), *In Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications*, p.157–168.
- Botelho, M.G.L.; Pimentel, B. dos S.; Furtado, L.G.; Lima, M. do C.S.; Carneiro, C.R. de O.; Batista, V. de A.; et al. 2020. Pesticides in agriculture: agents of environmental damage and the search for sustainable agriculture. *Society and Development* 21: 1–9.
- Brüssow, H. 2020. The Novel Coronavirus – Latest Findings. *Microbial Biotechnology* 13: 819–828.
- Bubici, G. 2018. *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Fusarium* species. *CAB*

- Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 13.
- Carneiro, F.F.; Augusto, L.G. da S.; Rigotto, R.M.; Friedrich, K.; Búrigo, A.C. 2015. *Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde*. In: Popular, E. (Ed.) Vol. 161.1120–1126p.
- Carroll, L.M.; Wiedmann, M. 2020. Proposal of a Taxonomic Nomenclature for the *Bacillus cereus* Group Which Reconciles Genomic Definitions of Bacterial Species with Clinical and Industrial Phenotypes. 11: 1–15.
- Carvalho, T.P.; Reis, R.E. 2020. A New Miniature Species of *Acanthobunocephalus* (Siluriformes: Aspredinidae) from the Lower Purus River Basin, Amazon Basin, Brazil. *Copeia* 108: 347.
- Casas, C.A.D. las. 2019. El bioma amazónico y el Acuerdo de París: cooperación y gobernanza. *Revista de estudios brasileños* 6: 155.
- Che, J.W.J.; Cetin, Q.C.; Li, B.L.W. 2019. Genome-based reclassification of *Bacillus plakortidis* Borchert et al . 2007 and *Bacillus lehensis* Ghosh et al . 2007 as a later heterotypic synonym of *Bacillus oshimensis* Yumoto et al . 2005 ; *Bacillus rhizosphaerae* Madhaiyan et al . 2011 as a later heter. *Antonie van Leeuwenhoek* 112: 1725–1730.
- Costa, J.F.V. da; Alves, N.S.M. 2018. Os recursos estratégicos da Amazônia brasileira e a cobiça internacional. *Revista Perspectiva: reflexões sobre a temática internacional* 11: 65–86.
- Dede, A.; Güven, K.; Şahin, N. 2020. Isolation, plant growth-promoting traits, antagonistic effects on clinical and plant pathogenic organisms and identification of actinomycetes from olive rhizosphere. *Microbial Pathogenesis* 143.
- Dhillon, K.S.; Kaur, S.J.; Khanmotra, A. 2020. Actinomycosis in a Holstein heifer : Diagnosis treatment and management. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 8: 104–106.
- Dilnashin, H.; Birla, H.; Hoat, T.X.; Singh, H.B.; Singh, S.P.; Keswani, C. 2020. *Applications of agriculturally important microorganisms for sustainable crop production*. INC, 403–416p.
- Doherty, M.; Yager, P.L.; Moran, M.A.; Coles, V.J.; Fortunato, C.S.; Krusche, A. V.; et al. 2017. Bacterial biogeography across the Amazon River-ocean continuum. *Frontiers in Microbiology* 8: 1–17.
- Dunlap, C. 2019. Phylogeny and Taxonomy of Agriculturally Important *Bacillus* Species. In: *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol*, p.143–150.
- Dunlap, C.A. 2020. Genomic and phenotypic characterization of *Bacillus velezensis* AMB-y1 ; a potential probiotic to control pathogens in aquaculture. *Antonie van Leeuwenhoek* 5.
- Dunlap, C.A.; Kwon, S.; Rooney, A.P.; Kim, S.; Kim, S. 2015. *Bacillus paralicheniformis* sp . nov ., isolated from fermented soybean paste. : 3487–3492.
- Ehling-Schulz, M.; Lereclus, D.; Koehler, T.M. 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum* 7.
- Fan, B.; Wang, C.; Song, X.; Ding, X.; Wu, L.; Wu, H.; et al. 2018. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018 : The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. 9: 1–14.
- Farraj, D.A. Al; Varghese, R.; Vágvölgyi, C.; Elshikh, M. soliman; Al-Oqda, A.M.; Mahmoud, A.H. 2019. Antibiotics production in optimized culture condition using low cost substrates from *Streptomyces* sp . AS4 isolated from mangrove soil substrates from *Streptomyces* sp . AS4 isolated from mangrove soil. *Journal of King Saud University - Science*.
- Fira, D.; Dimkić, I.; Berić, T.; Lozo, J.; Stanković, S. 2018. Head of the Department of Biochemistry and Molecular Biology ., *Journal of Biotechnology* 285: 44–55.
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-

- forming bacteria. *Phytopathology* 94: 1245–1248.
- Gagneux, S. 2018. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Publishing Group* 16: 202–213.
- Gao, Y.; Zeng, X.D.; Ren, B.; Zeng, J.R.; Xu, T.; Yang, Y.Z.; et al. 2020. Antagonistic activity against rice blast disease and elicitation of host-defence response capability of an endophytic *Streptomyces albidoflavus* OsiLf-2. *Plant Pathology*: 259–271.
- Gao, Z.; Zhang, B.; Liu, H.; Han, J.; Zhang, Y. 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 105: 27–39.
- Gomes, E.D.B.; Dias, L.R.L.; Miranda, R.D.C.M. De. 2018. Actinomycetes bioactive compounds : Biological control of fungi and phytopathogenic insect. 17: 552–559.
- González, V.; Vargas-Straube, M.J.; Beys-da-Silva Walter O.; Santi, L.; Valencia, P.; Beltrametti, F.; et al. 2020. Enzyme Bioprospection of Marine-Derived Actinobacteria from the Chilean Coast and New Insight in the Mechanism of Keratin Degradation in. *Marine Drugs* 18: 1–26.
- Goswami, D.; Thakker, J.N.; Dhandhukia, P.C. 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture* 19.
- Lo Grasso, L.; Chillura Martino, D.; Alduina, R. 2016. Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes. .
- Grasso, L. Lo; Martino, D.C.; Alduina, R.; Lo Grasso, L.; Chillura Martino, D.; Alduina, R. 2016. Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*.
- Gunasinghe, Y.H.K.I.S.; Edirisinghe, E.A.A.D. 2020. Industrially Important Enzyme and Plant Growth Promoter Potential of Soil Actinomycetes. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology* 7.
- Guo, Y.P.; Zheng, W.; Rong, X.Y.; Huang, Y. 2008. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: Use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 149–159.
- Harir, M.; Bendif, H.; Bellahcene, M.; Fortas, Z.; Pogni, R. 2018. *Streptomyces* Secondary Metabolites. In: *IntechOpen*, Vol. 32, p.99–122.
- Jayashantha, E. 2015. Actinobacteria- Morphology, Physiology, biochemistry, diversity & Industrial Applications of genus Actinobacteria. .
- Jiang, Y.; Li, Q.; Chen, X.; Jiang, C. 2016. Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria. *Design, Control and Applications of Mechatronic Systems in Engineering*: 135–152.
- Jin, L.; Zhao, Y.; Song, W.; Duan, L.; Jiang, S.; Wang, X.; et al. 2019. *Streptomyces inhibens* sp. Nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of wheat (*triticum aestivum* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69: 688–695.
- Johnston, C.W.; Skinnider, M.A.; Dejong, C.A.; Rees, P.N.; Chen, G.M.; Walker, C.G.; et al. 2016. Assembly and clustering of natural antibiotics guides target identification. *Nature Chemical Biology* 12: 233–239.
- Jose, P.A.; Jha, B. 2017a. Intertidal marine sediment harbours Actinobacteria with promising bioactive and biosynthetic potential. *Scientific Reports* 7: 1–15.
- Junk, W.J.; Wittmann, F.; Schöngart, J.; Piedade, M.T.F. 2015. A classification of the major habitats of Amazonian black-water river floodplains and a comparison with their white-water counterparts. *Wetlands Ecology and Management* 23: 677–693.
- Kaspar, F.; Neubauer, P.; Gimpel, M. 2019. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Products*.

- Köhl, J.; Kolnaar, R.; Ravensberg, W.J. 2019. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases : Relevance Beyond Efficacy. 10: 1–19.
- Kresge, N.; Simoni, R.D.; Hill, R.L. 2005. Selman Waksman : the Father of Antibiotics. 279: 101–103.
- Kuebutornye, F.K.A.; Abarike, E.D.; Lu, Y. 2019. Fish and Shell fish Immunology A review on the application of Bacillus as probiotics in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology* 87: 820–828.
- Labeda, D.P.; Dunlap, C.A.; Rong, X.; Huang, Y.; Doroghazi, J.R.; Ju, K.S.; et al. 2017. Phylogenetic relationships in the family Streptomycetaceae using multi-locus sequence analysis. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 110: 563–583.
- Larsen, B.B.; Miller, E.C.; Rhodes, M.K. 2017. Inordinate fondness multiplied and redistributed: the number of species on earth and the new pie of life inordinate fondness multiplied and redistributed: the number of species on earth and the new pie of life. *The quarterly review of biology* 92: 229–265.
- Law, J.W.-F.; Tan, K.-X.; Wong, S.H.; Ab Mutalib, N.-S.; Lee, L.-H. 2018. Taxonomic and Characterization Methods of Streptomyces: A Review. *Progress In Microbes & Molecular Biology* 1: 1–13.
- Law, J.W.-F.; Letchumanan, V.; Tan, L.T.-H.; Ser, H.-L.; Goh, B.-H.; Lee, L.-H. 2020. The Rising of “Modern Actinobacteria” Era. *Progress In Microbes & Molecular Biology* 3: 1–6.
- Law, J.W.F.; Ser, H.L.; Ab Mutalib, N.S.; Saokaew, S.; Duangjai, A.; Khan, T.M.; et al. 2019. Streptomyces monashensis sp. nov., a novel mangrove soil actinobacterium from East Malaysia with antioxidative potential. *Scientific Reports* 9: 1–18.
- Lawson, P.A. 2018. *Chapter 1 - The Phylum Actinobacteria*. Elsevier Inc., 1–8p.
- Lennon, J.T.; Locey, K.J. 2020. More support for Earth ’ s massive microbiome. *Biology Direct*: 1–6.
- Lewin, G.R.; Carlos, C.; Chevrette, M.G.; Horn, H.A.; McDonald, B.R.; Stankey, R.J.; et al. 2016. Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications. *Annual Review of Microbiology*.
- Li, Q.; Chen, X.; Jiang, Y.; Jiang, C. 2016a. Morphological Identification of Actinobacteria. In: *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, .
- Ling, L.; Han, X.; Li, X.; Zhang, X.; Wang, H.; Zhang, L.; et al. 2020. A streptomyces Sp. NEAU-HV9: Isolation, identification, and potential as a biocontrol agent against ralstonia solanacearum of tomato plants. *Microorganisms* 8: 1–14.
- Liu, B.; Liu, G.H.; Wang, X.Y.; Wang, J.P.; Chen, Z.; Chen, M.C.; et al. 2019. Bacillus urbisdiaboli sp. Nov., isolated from soil sampled in xinjiang. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69: 1591–1596.
- Liu, G.; Prabhu, M.; Rao, N.; Dong, Z.; Wang, J.; Che, J.; et al. 2019b. Genome-based reclassification of Bacillus okuhidensis as a later heterotypic synonym of Bacillus halodurans. : 3599–3602.
- Liu, X.; Kokare, C. 2017. *Microbial Enzymes of Use in Industry*. Elsevier Inc., 267–298p.
- Liu, Y.; Du, J.; Lai, Q.; Zeng, R.; Ye, D.; Xu, J.; et al. 2017. Proposal of nine novel species of the Bacillus cereus group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 2499–2508.
- Louca, S.; Mazel, F.; Doebeli, M.; Parfrey, L.W. 2019. A census-based estimate of Earth ’ s bacterial and archaeal diversity. *PLoS Biology* 17: 1–30.
- Maciejewska, M.; Pessi, I.S.; Arguelles-Arias, A.; Noifalisse, P.; Luis, G.; Ongena, M.; et al. 2015. Streptomyces lunaelactis sp. nov., a novel ferroverdin A-producing Streptomyces

- species isolated from a moonmilk speleothem. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 107: 519–531.
- Mandic-Mulec, I.; Stefanic, P.; van Elsas, J.D. 2015. Ecology of Bacillaceae. *Microbiology Spectrum* 3.
- Manteca, Á.; Yagüe, P. 2018. Streptomyces Differentiation in Liquid Cultures as a Trigger of Secondary Metabolism. : 1–13.
- Marden, E.; Abbott, R.J.; Rieseberg, L.H. 2020. Sharing and reporting benefits from biodiversity research. *Molecular Ecology*: 1–5.
- Mast, Y.; Stegmann, E. 2019. Actinomycetes: The antibiotics producers. *Antibiotics* 8.
- Meij, A. Van Der; Worsley, S.F.; Hutchings, M.I.; Wezel, G.P. Van. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. : 392–416.
- Mohamed, H.; Miloud, B.; Zohra, F.; García-Arenzana, J.M.; Veloso, A.; Rodríguez-Couto, S. 2017. Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara Soils with Antimicrobial Activities. *International journal of molecular and cellular medicine* 6: 109–120.
- Mukhtar, S.; Zaheer, A.; Aiysha, D.; Malik, K.A.; Mehnaz, S. 2017. Actinomycetes : A Source of Industrially Important Enzymes Proteomics & Bioinformatics. 10: 316–319.
- Mullins, A.J.; Li, Y.; Qin, L.; Hu, X.; Xie, L.; Gu, C.; et al. 2020. Reclassification of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* BY-2 and Tu-100 as *Bacillus velezensis* and insights into the genomic and specialized metabolite diversity of the species. : 1121–1128.
- Nakashima, Y.T. and T. 2018. Actinomycetes , an Inexhaustible Source of Naturally. *Antibiotics* 7.
- Nawaz, H.H.; Rajaofera, M.J.N.; He, Q.; Anam, U.; Lin, C.; Miao, W. 2018. Evaluation of antifungal metabolites activity from bacillus licheniformis OE- 04 against *Colletotrichum gossypii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.
- Oberdorff, T.; Dias, M.S.; Jézéquel, C.; Albert, J.S.; Arantes, C.C.; Bigorne, R.; et al. 2019. Unexpected fish diversity gradients in the Amazon basin. *Science Advances*: 1–10.
- Palla, M.S.; Guntuku, G.S.; Muthyala, M.K.K.; Pingali, S.; Sahu, P.K. 2018. Isolation and molecular characterization of antifungal metabolite producing actinomycete from mangrove soil. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 7: 250–256.
- Pieterse, M.J.; Zamioudis, C.; Berendsen, R.L.; Weller, D.M.; Wees, S.C.M. Van; Bakker, P.A.H.M. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. .
- Procópio, R.E. de L.; Silva, I.R. da; Martins, M.K.; Azevedo, J.L. de; Araújo, J.M. de. 2012. Review article Antibiotics produced by Streptomyces. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16: 466–471.
- Quinn, G.A.; Banat, A.M.; Abdelhameed, A.M.; Banat, I.M. 2020. Streptomyces from traditional medicine : sources of new innovations in antibiotic discovery. : 1040–1048.
- Ranjani, A.; Dhanasekaran, D.; Gopinath, P.M. 2016a. An Introduction to Actinobacteria. In: *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, .
- Rao, M.P.N.; Dong, Z.-Y.; Liu, G.-H.; Li, L.; Xiao, M.; Li, W.-J. 2020. Reclassification of *Bacillus aryabhattai* Shivaji et al . 2009 as a later heterotypic synonym of *Bacillus megaterium* de Bary 1884 (Approved Lists 1980). *FEMS Microbiology Letters* 366: 1–3.
- Razzaq, A.; Shamsi, S.; Ali, A.; Ali, Q.; Sajjad, M.; Malik, A.; et al. 2019. Microbial Proteases Applications. 7: 1–20.
- Rishad, K.S.; Rebello, S.; Shabanamol, P.S.; Jisha, M.S. 2017. Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus Pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 137: 36–

41.

- Rong, X.; Huang, Y. 2012. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Systematic and Applied Microbiology* 35: 7–18.
- Sadeghian, M.; Bonjar, G.H.S.; Sirchi, G.R.S. 2016. Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne Actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. *Postharvest Biology and Technology* 112: 46–54.
- Salam, N.; Jiao, J.Y.; Zhang, X.T.; Li, W.J. 2020. Update on the classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70: 1331–1355.
- Salwan, R.; Sharma, V. 2020. *Bioactive compounds of Streptomyces: Biosynthesis to applications*. Vol. 64. 1st ed. Elsevier Inc., 467–491p.
- Salwan, R.; Sharma, V.; Sharma, A.; Singh, A. 2020. Molecular imprints of plant beneficial *Streptomyces* sp. AC30 and AC40 reveal differential capabilities and strategies to counter environmental stresses. *Microbiological Research* 235: 126449.
- Saxena, A.K.; Kumar, M.; Chakdar, H.; Anuroopa, N.; Bagyaraj, D.J. 2019. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology* 128: 1583–1594.
- Sengupta, S.; Pramanik, A.; Ghosh, A.; Bhattacharyya, M. 2015. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *BMC Microbiology*: 1–16.
- Sevillano, L.; Vijgenboom, E.; van Wezel, G.P.; Díaz, M.; Santamaría, R.I. 2016. New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces lividans*. *Microbial Cell Factories* 15: 1–10.
- Shafi, J.; Tian, H.; Ji, M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens : a review. 2818.
- Shaik, M.; Girija Sankar, G.; Iswarya, M.; Rajitha, P. 2017. Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
- Shirling, E.B.; Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 16: 313–340.
- Singh, H.; Naik, B.; Kumar, V.; Bisht, G.S. 2018. Screening of endophytic actinomycetes for their herbicidal activity. *Annals of Agrarian Science*.
- Son, J.; Hwang, Y.; Lee, S.; Ghim, S. 2019. *Bacillus salidurans* sp . nov ., isolated from salt-accumulated pepper rhizospheric soil. : 116–122.
- Subbanna, A.R.N.S.; Chandrashekara, C.; Stanley, J.; Mishra, K.K.; Mishra, P.K.; Pattanayak, A. 2019. Bio-e ffi cacy of chitinolytic *Bacillus thuringiensis* isolates native to northwestern Indian Himalayas and their synergistic toxicity with selected insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 158: 166–174.
- Subramaniam, G.; Arumugam, S.; Rajendran, V. 2016. *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*. Vol. 59. 57–64p.
- Sudiana, I.M.; Putri, A.; Napitupulu, T.P.; Purnaningsih, I.; Kanti, A. 2020. Growth inhibition of *Fusarium solani* and *F . oxysporum* by *Streptomyces s asae* TG01 , and its ability to solubilize insoluble phosphate. 21: 429–435.
- Swarna, D.; Gnanadoss, J.J. 2020. Screening and Molecular Characterization of Actinomycetes from Mangrove Soil Producing Industrially Important Enzymes. 64: 87–95.
- Sylvain, F.É.; Holland, A.; Audet, É.; Luis, A.; Nicolas, V. 2019. Amazon fish bacterial

- communities show structural convergence along widespread hydrochemical gradients. : 3612–3626.
- Thampi, A.; Bhai, R.S. 2017. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biological Control* 109: 1–13.
- Tonial, F.; Falcão, F.; Nava, D.M.; Gayger, A.L.; Mar, T.B. 2020. *Endophytes Potential Use in Crop Production*. .
- Udaondo, Z.; Matilla, M.A. 2020. Mining for novel antibiotics in the age of antimicrobial resistance. *Microbial Biotechnology* 13: 1702–1704.
- Vaijayanthi, G.; Vijayakumar, R.; Dhanasekaran, D. 2016. Actinobacteria — A Biofactory of Novel Enzymes. In: *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, .
- Val, A.L. 2019. Conservação da biota aquática da Amazônia. *REVISTA DE ESTUDIOS BRASILEÑOS - REB* 6: 79–89.
- Valdés Ramírez, M.; Calzadiaz, L. 2016. Industrial Enzymes and Metabolites from Actinobacteria in Food and Medicine Industry. In: *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, .
- Valenzuela-Ruiz, V.; Galvez-Gamboa, Gema Villa-Rodriguez, E.; Parra-cota, F.; Santoyo, G.; de los Santos-Villalobos, S. 2020. Lipopeptides produced by biological control agents of the genus *Bacillus* : a review of analytical tools used for their study. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11: 419–432.
- Verma, J.P.; Jaiswal, D.K.; Krishna, R.; Prakash, S.; Yadav, J.; Singh, V. 2018. Characterization and screening of thermophilic *Bacillus* strains for developing plant growth promoting consortium from hot spring of Leh and Ladakh region of India. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–15.
- Vurukonda, S.S.K.P.; Giovanardi, D.; Stefani, E. 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of streptomycetes spp. As endophytes. *International Journal of Molecular Sciences* 19.
- Wang, C.; Lu, Y.; Cao, S. 2020. Antimicrobial compounds from marine actinomycetes. *Archives of Pharmacal Research* 43: 677–704.
- Wang, Y.; Jiang, Y. 2016a. Chemotaxonomy of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*: 257–297.
- Wang, Y.; Jiang, Y. 2016b. Chemotaxonomy of Actinobacteria. .
- Wei, Y.; Zhao, Y.; Zhou, D.; Qi, D.; Li, K.; Tang, W. 2020. A Newly Isolated Streptomycetes sp . YYS-7 With a Broad-Spectrum Antifungal Activity Improves the Banana Plant Resistance to *Fusarium oxysporum* f . sp . cubense Tropical Race 4. 11: 1–14.
- Wenzel, M. 2020. Do we really understand how antibiotics work ? 15: 1307–1311.
- Wink, J.; Mohammadipanah, F.; Hamedi, J. 2017. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. .
- Wittmann, F.; Marques, C.M.M.; Júnior, G.D.; Budke, J.C.; Piedade, M.T.F.; Wittmann, A. de O.; et al. 2017. The Brazilian freshwater wetlands : Changes in tree community diversity and composition on climatic and geographic gradients. *PLoS ONE* 12(4): 1–18.
- Wohlleben, W.; Mast, Y.; Stegmann, E.; Ziemert, N. 2016. Antibiotic drug discovery. *Microbial Biotechnology* 9: 541–548.
- Wonglom, P.; Suwannarach, N.; Lumyong, S.; Ito, S.; Matsui, K. 2019. Streptomycetes *angustmyceticus* NR8-2 as a potential microorganism for the biological control of leaf spots of *Brassica rapa* subsp . *pekinensis* caused by *Colletotrichum* sp . and *Curvularia lunata*. *Biological Control* 138: 104046.
- Yi, Y.; Zhang, Z.; Zhao, F.; Liu, H.; Yu, L.; Zha, J.; et al. 2018. Fish and Shellfish Immunology Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW : Antimicrobial activity against fish

- pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. *Fish and Shellfish Immunology* 78: 322–330.
- Yu, Z.; Han, C.; Yu, B.; Zhao, J.; Yan, Y.; Huang, S.; et al. 2020. Taxonomic characterization, and secondary metabolite analysis of *Streptomyces triticiradicis* sp. Nov.: A novel actinomycete with antifungal activity. *Microorganisms* 8: 1–17.
- Zaineldin, A.I.; Hegazi, S.; Koshio, S.; Ishikawa, M.; Bakr, A.; El-keredy, A.M.S.; et al. 2018. Fish and Shellfish Immunology *Bacillus subtilis* as probiotic candidate for red sea bream : Growth performance , oxidative status , and immune response traits. *Fish and Shellfish Immunology* 79: 303–312.
- Zhang, K.; Gu, L.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Li, X. 2020a. Dinactin from a new producer, *Streptomyces badius* gz-8, and its antifungal activity against the rubber anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological Research*: 126548.
- Zhang, Q.Y.; Liu, C.F.; Wang, Y.; Xia, Z.F.; Huang, Y.J.; Luo, X.X. 2020b. *Streptomyces roseicoloratus* sp. Nov., isolated from cotton soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70: 738–743.
- Zhao, P.; Xue, Y.; Gao, W.; Li, J.; Zu, X.; Fu, D.; et al. 2018. Bacillaceae -derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides*.
- Zohora, U.S.; Ano, T.; Rahman, M.S. 2016. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by Iturin A Producer *Bacillus subtilis* RB14 Seed Treatment in Tomato Plants. : 424–431.