



JOÃO CARLOS MAIA DORNELAS DE OLIVEIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOMICETOS PARA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS E BIOCONTROLE *IN
VITRO* DE *Pantoea ananatis*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA-BRANCA
DO MILHO**

SETE LAGOAS-MG

2017

JOÃO CARLOS MAIA DORNELAS DE OLIVEIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOMICETOS PARA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS E BIOCONTROLE *IN*
VITRO DE *Pantoea ananatis*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA-BRANCA
DO MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Sete Lagoas - MG, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Coorientador: Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana

SETE LAGOAS-MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

0048p

Oliveira, João Carlos Maia Dornelas de.

Potencial biotecnológico de actinomicetos para produção de enzimas hidrolíticas e biocontrole in vitro de *Pantoea ananatis*, agente causal da Mancha branca do milho / João Carlos Maia Dornelas de Oliveira ; orientador Ivanildo Evódio Marriel; coorientador Ubiraci Gomes de Paula Lana. -- Sete Lagoas, 2017.

94 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2017.

1. Actinomicetos - biotecnologia. 2. Biocontrole de *Pantoea ananatis*. 3. Enzimas hidrolíticas. I. Marriel, Ivanildo Evódio , orient. II. Lana, Ubiraci Gomes de Paula, co-orient. III. Título.

JOÃO CARLOS MAIA DORNELAS DE OLIVEIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOMICETOS PARA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS E BIOCONTROLE *IN*
VITRO DE *Pantoea ananatis*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA-BRANCA
DO MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Sete Lagoas - MG, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Coorientador: Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana

Sete Lagoas-MG, 20 de fevereiro de 2017.

Banca examinadora:

Dra. Eliane Aparecida Gomes – Embrapa Milho e Sorgo

Dr. Frederick Mendes Aguiar – Embrapa Milho e Sorgo

Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

(Orientador)

EPÍGRAFE

“Tudo o que descobrimos é apenas um pouco em comparação com o que está escondido no grande tesouro da natureza”.

Antonie van Leeuwenhoek

DEDICATÓRIA

À minha mãe Icléia, minhas irmãs Camila e Aline e ao Gigi, amores da minha vida,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu Deus, responsável por tudo.

À minha mãe, Icléia, pela força, perseverança e amor infinito. Meu exemplo absoluto.

Ao Gigi, pelo imenso amor, paciência e companheirismo.

Às minhas irmãs Camila e Aline, pelo carinho e apoio.

À Universidade Federal de São João del-Rei – UFSJ, Campus Sete Lagoas – CSL, à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Embrapa Milho e Sorgo, pela estrutura para realização do trabalho.

Ao Prof^o. Dr. Ivanildo Evódio Marriel, pela orientação, confiança e ensinamentos que foram de grande relevância para realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana, pelo acompanhamento, disponibilidade, incentivo no desenvolvimento da pesquisa e suporte nas análises moleculares.

Aos professores do programa de Pós-Graduação, por suas colaborações.

Aos membros da banca, pela prontidão ao convite para compor a mesa.

Às equipes do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo e do Núcleo de Biologia Aplicada, pelo auxílio e ajuda na condução do experimento, em especial a Amanda, Bárbara, Bianca, Clara, Diego, Fabrício, Fernanda, Jaíne, Joice, Laiane, Marcela e Ramon.

À equipe do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, pela parceria e execução das análises cromatográficas, em especial a Ana Cláudia, Cristiana, Flávio e Mary.

Às amigas Ana Laura, Denise, Izabelle, Matilde, Mikaely e Talita, pela amizade, risadas e troca de experiências.

Às amigas Crísia e Elaine, pela amizade e valiosa ajuda e contribuição neste trabalho.

Ao Prof. José Edson, pelo comprometimento, prontidão e conhecimento compartilhado.

Aos meus companheiros de mestrado, pelos momentos que jamais serão esquecidos.

Obrigado a todos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1. Cultura do milho.....	2
2.2. Mancha-branca do milho.....	4
2.3. Biocontrole.....	6
2.4. Actinomicetos.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Reativação dos isolados.....	13
3.2. Caracterização morfológica de actinomicetos.....	14
3.2.1. Macromorfologia.....	14
3.2.2. Micromorfologia.....	15
3.3. Caracterização molecular de actinomicetos.....	15
3.3.1. Extração de DNA.....	15
3.3.2. Amplificação do gene 16S rRNA.....	17
3.3.3. Sequenciamento de DNA.....	17
3.3.4. Análise filogenética.....	18
3.4. Caracterização enzimática de actinomicetos.....	19
3.4.1. Produção de amilase.....	19
3.4.2. Produção de celulase.....	19
3.4.3. Produção de lipase.....	20
3.4.4. Índice enzimático.....	20
3.5. Antibiograma.....	20
3.6. Avaliação da atividade antibacteriana dos isolados de actinomicetos frente à <i>P. ananatis</i>	21
3.6.1. Seleção primária dos isolados de actinomicetos em meio sólido.....	21

3.6.2. Seleção secundária dos isolados de actinomicetos em meio líquido.....	22
3.6.3. Análise de agentes microbianos produzidos por isolados de actinomicetos.....	23
3.6.3.1. Extração com ácido tricloroacético (TCA).....	23
3.6.3.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas.....	23
3.7. Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Caracterização morfológica de actinomicetos	25
4.2. Caracterização molecular de actinomicetos.....	30
4.3. Caracterização enzimática de actinomicetos.....	35
4.3.1. Detecção da atividade amilolítica.....	35
4.3.2. Detecção da atividade celulolítica.....	37
4.3.3. Detecção da atividade lipolítica.....	38
4.4. Antibiograma.....	44
4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados de actinomicetos.....	48
4.5.1. Seleção primária dos isolados de actinomicetos em meio sólido.....	48
4.5.2. Avaliação temporal da atividade antibacteriana nos líquidos metabólitos dos isolados de actinomicetos.....	53
4.5.3. Prospecção e identificação de resíduos de antibióticos nos líquidos metabólitos dos isolados de actinomicetos.....	57
5. CONCLUSÕES.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOMICETOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS E BIOCONTROLE *IN VITRO* DE *Pantoea ananatis*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA-BRANCA DO MILHO

RESUMO - A mancha-branca do milho, causada pela bactéria *Pantoea ananatis*, é uma doença economicamente importante em todas as regiões produtoras do Brasil. Nas últimas décadas, a severidade de doenças foliares nesta cultura se intensificou, e o uso de agroquímicos é a principal medida de controle da doença. Entretanto, o uso destes produtos na agricultura apresenta algumas limitações quanto à eficiência, custos econômicos e ambientais. Assim, a busca de alternativas, como controle biológico, torna-se de grande interesse dentro dos preceitos de práticas agrícolas sustentáveis. Actinomicetos são fontes de diversos metabólitos bioativos com atividade antagonista vários micro-organismos. O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de actinomicetos com potencial para o biocontrole de *P. ananatis* e produção de enzimas hidrolíticas depositados na Coleção de Micro-organismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo. Após testes de pureza das culturas, a atividade antagonista dos isolados de actinomicetos contra a bactéria foi realizada utilizando a técnica de sobrecamada na presença e ausência de luz UV e confirmada pela formação de halos de inibição. Os isolados com atividade antagonista foram cultivados em meio líquido e os extratos de cultura foram utilizados para obter o perfil de antibiótico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotômetro de massas. Os isolados de actinomicetos foram caracterizados morfológicamente com base no padrão de coloração do micélio aéreo e vegetativo bem como pela morfologia da cadeia de esporos. Além disso, a caracterização molecular foi realizada por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A produção de enzimas hidrolíticas amilase, celulase e lipase foi estimada em meio sólido específico pela determinação do índice enzimático (IE). Os resultados mostraram alta variabilidade morfológica e molecular entre os isolados de actinomicetos. A análise molecular revelou a presença de três gêneros: *Streptomyces* (82,6%), *Amycolatopsis* (10,1%) e *Kitasatospora* (7,3%) entre os isolados testados. O IE variou de 0 a 6,56 revelando o alto potencial biotecnológico de alguns isolados. Os isolados AM₅J 45 (*S. curacoii*) e LD 6 (*S. hygrosopicus*) apresentaram os maiores valores de amilase, enquanto que os isolados AR_LJ 48 (*S. chiangmaiensis*) e AR_LJ 53 (*S. cylabdanicus*) para celulase e LD 6 (*S. hygrosopicus*) para lipase. Em relação à atividade antagônica, os isolados A 470 (*S. pseudovenezuelae*) A 432 (*S. novaecaesareae*) e KACP 35 (*S. laculatispora*) foram os mais eficientes para inibir o crescimento de *P. ananatis*. A análise do perfil antibiótico indicou fortemente a produção de neomicina que pode estar associada a atividade antagonista do isolado A470 o que foi confirmado pela inibição do crescimento da bactéria utilizando o teste de difusão de disco com este antibiótico. Os resultados apresentados neste estudo mostraram alta variabilidade bioquímica e genética entre os actinomicetos com alto potencial de uso em processos industriais e a identificação de estirpes que podem ser utilizadas no biocontrole de *P. ananatis*.

“Palavras-chave”: actinobactéria; caracterização morfológica e molecular; atividade antagonista; doença foliar; controle biológico

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF ACTINOMICETES FOR PRODUCTION OF HYDROLYTIC ENZYMES AND BIOCONTROL *IN VITRO* OF *Pantoea ananatis*, CAUSAL AGENT OF MAIZE WHITE SPOT DISEASE

ABSTRACT - The maize white spot disease, caused by the bacteria *Pantoea ananatis*, is an economically important disease in all producing regions of Brazil. In the last decades, the severity of foliar diseases in this crop has intensified, and the use of agrochemicals is the major measure of the disease control. However, the use of these products in agriculture has many limitations like the efficiency, and economic and environmental costs. Thus, the search for alternatives, such as biological control, becomes of great interest within the precepts of sustainable agricultural practices. Actinomycetes are sources of various bioactive metabolites with antagonist activity against various microorganisms. The objective of this work was to select actinomycetes isolates with potential for biocontrol of *P. ananatis* and production of hydrolytic enzymes deposited in the Collection of Multifunctional and Phytopathogenic Microorganisms of Embrapa Milho e Sorgo. After culture purity testing, the antagonist activity of the actinomycetes isolates against the bacterium was performed using the overlay technique in the presence and absence of UV light and confirmed by the formation of inhibiting halos. The selected isolates with antagonist activity were grown in liquid medium and the extracts of cultures were used to obtain the antibiotic profile using high-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrophotometer. Isolates of actinomycetes were characterized morphologically based on the color of the aerial and vegetative mycelium as well as by spore chain morphology. In addition, the molecular characterization was performed by partial sequencing of the 16S rRNA gene. The production of hydrolytic enzymes amylase, cellulase and lipase was estimated in specific solid medium by determining the enzymatic index (EI). The results showed high morphological and molecular variability among the isolates. Molecular analysis revealed the presence of three genera: *Streptomyces* (82.6%), *Amycolatopsis* (10.1%) and *Kitasatospora* (7.3%). The EI varied from 0 to 6.56 revealing the high biotechnological potential of some isolates. The isolates AMSJ 45 (*S. curacoii*) and LD 6 (*S. hygrosopicus*) showed the highest values for amylase; while the isolates ARLJ 48 (*S. chiangmaiensis*) and ARLJ 53 (*S. cyslabdanicus*) for cellulase, and LD 6 (*S. hygrosopicus*) for lipase. In relation to the antagonistic activity, the isolates A 470 (*S. pseudovenezuelae*), A 432 (*S. novaecaesareae*), and KACP 35 (*S. laculatispora*) were the highest efficient for inhibiting the growth of *P. ananatis*. The antibiotic profile analysis strongly indicated that the production of neomycin is responsible for the antagonistic activity of the isolate A470, which was confirmed by the inhibition of the bacterium growth using the disk diffusion test with this antibiotic. The results of the present study showed high biochemical and genetic variability among the actinomycetes with high potential uses in industrial processes and the identification of strains that may be used in the biocontrol of *P. ananatis*.

“Keywords”: actinobactéria; morphological and molecular characterization; antagonistic activity; foliar disease; biological control

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Características macromorfológicas e culturais dos isolados representativos de actinomicetos após cultivo em meio AGA por 14 dias a 28 °C. A1 à F1: imagem do anverso da placa (micélio aéreo e pigmento); A2 à F2: imagem do verso da placa (micélio vegetativo). (A) AE_pFSRII 5; (B) A 346; (C) ACJ 26; (D) ACSL 8; (E) KACP 35; (F) AE_pFSRII 31.....26
- Figura 2** – Características micromorfológicas da cadeia de esporos dos isolados representativos de actinomicetos após cultivo em meio AGA por 14 dias a 28 °C. (A) cadeia reta; (B) cadeia *retinaculum- apertum*; (C) cadeia em espiral; (D) cadeia flexível. Aumento de 1000 X.....30
- Figura 3.** Árvore Filogenética, gerada a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA derivada do método de neighbour-joining utilizando o modelo evolutivo Tamura 3 parameter e teste de *bootstrap* com 1000 replicatas. A espécie *Bacillus lentus* AB021189 foi usada como *outgroup*. Terminais marcados com um T representam sequências obtidas de “espécies tipo”.....34
- Figura 4.** Halo indicativo da produção da enzima amilase dos isolados de actinomicetos em meio de cultura ágar amido, incubados por 10 dias a 28 °C.....36
- Figura 5.** Halo indicativo da produção da enzima celulase dos isolados de actinomicetos em meio de cultura, suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono, incubados por 10 dias a 28 °C.....37
- Figura 6.** Halo de coloração azul indicativo da produção da enzima lipase por isolados de actinomicetos em meio de cultura, suplementado com óleo de oliva, incubados por 72 horas a 28 °C.....39
- Figura 7.** Halo de inibição indicativo da susceptibilidade de *Pantoea ananatis* a antimicrobianos comerciais, inoculada em meio de cultura BDA, incubado por 48 horas a 30 °C.....44
- Figura 8.** Halo de inibição indicativo da atividade antagônica dos actinomicetos frente a estirpe fitopatogênica *Pantoea ananatis* utilizando a técnica de sobrecamada.....48
- Figura 9.** Identificação do antibiótico neomicina produzido pelo isolado de actinomiceto A 470 em meio ISP-2 após 72 h de incubação. a) Cromatograma com a identificação da neomicina (3,77 min) e b) Transições massa/carga (m/z) típicas da neomicina.....59
- Figura 10.** Perfil do antibiótico neomicina. a) Cromatograma da neomicina padrão (3,77 min) e b) Transições m/z referentes ao padrão (controle positivo).....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos isolados de actinomicetos selecionados para estudo: origem, ano de coleta e identificação.....	14
Tabela 2. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	18
Tabela 3. Classificação do grau de atividade antimicrobiana em função do diâmetro dos halos de inibição obtidos nos ensaios de atividade.	21
Tabela 4. Características morfológicas dos isolados de actinomicetos obtidos de amostras de solo e sistema de compostagem e pertencentes à Coleção de Micro-organismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF- MS).....	27
Tabela 5. Identificação molecular dos isolados de actinomicetos a partir do sequenciamento de DNA do gene 16S rRNA	31
Tabela 6. Índice enzimático (IE) de amilase, celulase e lipase de isolados de actinomicetos da Coleção de Micro-organismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF- MS).....	41
Tabela 7. Atividade antimicrobiana contra as estirpes bacterianas de <i>Pantoea ananatis</i> utilizando antimicrobianos comerciais.....	47
Tabela 8. Eficiência da atividade antibacteriana e classificação do grau de atividade de isolados de actinomicetos contra duas estirpes fitopatogênicas da bactéria <i>Pantoea ananatis</i>	49
Tabela 9. Detecção de atividade antibacteriana utilizando líquido metabólito proveniente da inoculação dos isolados de actinomicetos A 470, A 432 e KACP 35 nos meios líquidos ISP-2 e M1 contra as estirpes fitopatogênicas de <i>Pantoea ananatis</i>	55

1. INTRODUÇÃO

Dentre os cereais mais cultivados no mundo, o milho (*Zea mays* L.) destaca-se pela utilização diversificada, principalmente na alimentação humana e animal, além da importância econômica e social. O Brasil tem se consolidado como o terceiro maior produtor mundial, depois dos Estados Unidos e da China (FAO, 2016). Entretanto, a cultura do milho está sujeita à ocorrência de várias doenças que podem afetar a produção, a qualidade e o valor nutritivo dos grãos.

No Brasil, a mancha-branca, causada pela bactéria *Pantoea ananatis*, é considerada como uma das principais doenças foliares da cultura do milho e tem se destacado pelo significativo aumento na incidência e severidade nas regiões produtoras, podendo reduzir a produção de grãos em cerca de 60% em cultivares suscetíveis (Costa et al., 2011). O cultivo de híbridos resistentes e o uso de agrotóxicos são as medidas sugeridas para controlar a doença, entretanto, o uso destes produtos na agricultura apresenta algumas limitações.

A quebra de resistência dos fitopatógenos às moléculas utilizadas e os elevados custos dos defensivos agrícolas têm promovido amplo debate sobre alternativas de controle das doenças foliares, visando desenvolver programas de manejo de maneira sustentável. O controle biológico por meio do uso de micro-organismos como agentes naturais constitui alternativa viável, promissora e ecologicamente correta para controle de doenças de plantas (Brito et al., 2013). A prospecção de micro-organismos com potencial para uso no biocontrole de doenças de plantas tem se tornado um dos principais alvos da pesquisa agrícola nas últimas décadas (Filho et al., 2009). Diversos estudos têm identificado micro-organismos antagonistas eficientes para o controle biológico (Lanna Filho et al., 2010; Verdolin et al., 2013). Os actinomicetos têm desempenhado papel importante em razão da elevada capacidade em produzir substâncias antimicrobianas capazes de controlar importantes fitopatógenos em diferentes culturas (Siqueira, 1988; Moura & Romeiro, 1999; Filho et al., 2009; Sahilah et al., 2010).

A proposta deste trabalho consistiu em efetuar a prospecção de isolados de actinomicetos pertencentes à Coleção de Micro-organismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CCMF-MS) quanto à atividade antagonista contra *Pantoea ananatis* e produção de enzimas hidrolíticas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma monocotiledônea pertencente à família *Poaceae*, com ciclo fenológico variando de 90 a 205 dias, dependendo do genótipo e do clima. É uma planta exigente em água, podendo ser cultivada em regiões onde as precipitações variam de 250-5.000 mm anuais sendo a temperatura ideal para o seu desenvolvimento compreendida entre 24 e 30 °C (EMBRAPA, 2006). Além disso, é uma planta C4, bastante eficiente na conversão de CO₂, apresentando altas taxas de fotossíntese líquida, mesmo em elevados níveis de luz (Fancelli & Dourado Neto, 2004), não tolerando luz difusa típica de tempo nublado ou chuvoso ou provocada pelo aumento da densidade de plantas (Miranda et al., 2007).

Natural das Américas, provavelmente do México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos, o milho foi introduzido na Europa após o descobrimento da América onde passou a ser cultivado em jardins até tornar-se conhecido em razão do seu valor alimentício (Fancelli & Dourado Neto, 2004). Com a expansão para outras partes do mundo, este cereal passou a ser cultivado em escala comercial e consumido em todos os continentes (Abimilho, 2015).

A ampla distribuição mundial da cultura do milho é fundamentada por vários fatores, tais como: composição e valor nutritivo; alta produção por unidade de trabalho e unidade de área; período extenso de colheita; pequenas perdas de grãos causadas por pássaros e chuvas; fonte de nutrição de fácil transporte e acondicionamento ao armazenamento (Romano, 2005).

De acordo com Borges et al. (2014), a utilização do milho é diversificada, podendo ser tanto na alimentação humana quanto na alimentação animal, além de servir como fonte de matéria-prima indispensável para agroindústria. Além disso, esta cultura também apresenta relevante importância social e econômica, principalmente na geração de empregos no setor primário (Fancelli & Dourado Neto, 2004).

A previsão para o total da área cultivada com milho no Brasil na safra 2016/2017 deverá ficar entre 15,9 e 16,1 milhões de hectares, mantendo-se similar à área cultivada na safra 2015/2016 (15,9 milhões de ha). A produtividade estimada é de 5.169 kg/ha, com aumento de 20% em relação à safra atual, sendo a produção brasileira esperada entre 82,3 e 83,8 milhões de toneladas, com elevação variando de 19% a 20,4% em relação à safra

vigente, quando foram colhidas 66,7 milhões de toneladas (CONAB, 2016). Neste cenário observa-se um aumento da estimativa de produção do milho em relação a safra corrente, a qual apresentou significativo decréscimo em função do espaço cedido para o plantio da soja, com valor mais atrativo de comercialização (CONAB, 2015). Segundo as estimativas, o Mato Grosso será o estado que mais produzirá milho no Brasil nesse mesmo período, atingindo uma produção de até 21,6 milhões de toneladas (CONAB, 2016).

Desde a década de 1970, a produtividade média de grãos de milho elevou-se em cinco vezes (CONAB, 2016). Contudo, estudos de projeção de demanda comprovam a necessidade do Brasil de elevar sua produção em mais de 19 milhões de toneladas afim de garantir o suprimento do mercado interno e obter excedente de mais 12 milhões de toneladas para exportação até a safra 2019/2020 (MAPA, 2016).

Em decorrência da exposição da cultura do milho aos diversos estresses bióticos e abióticos, tem sido difícil atingir o máximo potencial genético para a produtividade de grãos, independentemente do sistema produtivo adotado (Brito et al., 2013). Por ser uma cultura de ampla abrangência geográfica, encontra-se submetida às mais variadas condições edafoclimáticas, estando sujeita ao ataque de elevado número de patógenos que muitas das vezes promovem perdas significativas à cultura (Pozar et al., 2009).

No Brasil, as enfermidades que acometem a cultura do milho têm provocado queda de produtividade e da qualidade das sementes gerando perdas econômicas consideráveis (Brito et al., 2008). Alguns fatores têm colaborado para o acréscimo das doenças no campo, dentre os quais se destacam o aumento de inóculo proporcionado pela prática do plantio direto sobre restos culturais, pela sucessão de cultivos, pela manutenção inadequada da umidade proveniente da irrigação realizada por pivô central, pela expansão da área cultivada e pelo plantio de híbridos e variedades suscetíveis às doenças em regiões que apresentam grande risco de epidemias (Pinto et al., 1997; Manerba et al., 2013).

Dentre as diversas doenças de plantas que causam prejuízos expressivos no Brasil, destaca-se a mancha-branca, doença foliar existente em praticamente todas as regiões produtoras de milho, ocorrendo principalmente em cultivos tardios (Fantin, 1994; Fernandes & Oliveira, 1997; Cota et al., 2010; Costa et al., 2012) tanto na safra de verão como na safrinha (Rolim et al., 2007). A alta incidência e a severidade desta doença têm contribuído na redução significativa da produção de milho no país desde os anos 1990 (Fernandes & Oliveira, 1997; Lana et al., 2012).

2.2. Mancha-branca do milho

Inicialmente, a doença mancha-branca do milho foi descrita como mancha-foliar de *Phaeosphaeria*, e seu agente causal foi descrito como sendo o fungo *Phaeosphaeria maydis* (Rane et al., 1966), forma imperfeita de *Phyllosticta* sp. Entretanto, em função da ausência do fungo em determinadas lesões foliares em áreas com elevada incidência da doença e dificuldade de se reproduzir os sintomas com inoculação do suposto fitopatógeno em plantas de milho sob condições controladas, o agente etiológico da doença passou a ser questionado (Paccola-Meirelles et al., 2001; Cervelatti et al., 2002; Amaral et al., 2004; Carson, 2005; Carli, 2008; Manerba et al., 2013).

Estudando lesões jovens em folhas de milho, Paccola-Meirelles et al. (2001) isolaram com frequência uma bactéria gram-negativa de coloração amarelo-brilhante, identificada como *Pantoea ananatis* (sinonímia *Erwinia ananas*), sendo admitida, desde então, como o provável agente etiológico causador da mancha-branca por ser o único patógeno submetido com sucesso aos postulados de Kock. Posteriormente, Bomfeti et al. (2008) também confirmaram a presença de células bacterianas de *P. ananatis* no interior de lesões provocadas pela doença. No estudo realizado por Gonçalves et al. (2013), ficou definitivamente demonstrado que a bactéria *P. ananatis* é o agente causal da mancha-branca do milho e que os fungos descritos anteriormente como agentes etiológicos da doença são espécies saprófitas que se instalam tardiamente nos tecidos mortos, após a infecção bacteriana. Dados similares têm sido relatados para amostras de folhas coletados de plantas cultivadas sob diferentes condições edafoclimáticas (Silva et al., 2009; Costa et al., 2012; Pedro et al., 2012; Lanza et al., 2013; Manerba et al., 2013).

A incidência e a severidade da mancha-branca são influenciadas pelas condições climáticas (Rolim et al., 2007), sendo favorecida pela alta umidade relativa, acima de 60%, temperaturas noturnas em torno de 14 °C e elevada precipitação (Casela et al., 2006). De forma geral, a semeadura tardia em monocultivo, a presença de restos culturais, e, principalmente, o uso de irrigação em excesso são fatores que modulam a incidência de doenças do milho, principalmente aquelas causadas por bactérias (Fernandes & Oliveira, 1997). A disseminação da *P. ananatis* ocorre por respingos de chuva ou irrigação e pelo vento, podendo o inóculo primário ter origem nos restos culturais ou sementes (Walcott et al., 2002; Pereira et al., 2005; Sauer et al., 2015).

Os sintomas da mancha-branca do milho caracterizam-se, no início, por lesões aquosas e verde-claras (anasarcas) que evoluem para acinzentadas a necróticas, de coloração palha, apresentando-se em número variável e em formas circulares a elípticas (Pinto & Fernandes, 1995; Fernandes & Oliveira, 1997; Pinto, 2004). O progresso da enfermidade sob condições favoráveis pode ocasionar a senescência e seca prematura das folhas, diminuindo drasticamente o ciclo e a produtividade, sendo variável a quantidade e o tamanho das lesões entre as variedades (Fernandes & Oliveira, 1997; Paccola-Meirelles et al., 2001; Malagi et al., 2011).

Normalmente, as lesões da mancha-branca são encontradas dispersas no limbo foliar, mas iniciam-se na ponta da folha, avançando para a base, podendo coalescer (Costa et al., 2010, 2011). Em geral, os sintomas aparecem, primeiramente, nas folhas inferiores, progredindo rapidamente para o ápice da planta e tornando-se mais expressivos após o pendoamento (Fernandes & Oliveira, 1997; Pegoraro et al., 2001).

Patógenos que afetam a cultura do milho constituem um dos principais entraves aos ganhos na produtividade (Juliatti et al., 2014). As cultivares suscetíveis à mancha-branca podem chegar a apresentar redução de cerca de 60% na produtividade por causa da redução no tamanho e peso do grão causado pela doença (Fernandes & Oliveira, 1997; Pinto et al., 1997; Brito et al., 2011). Segundo Costa et al. (2011), as principais medidas sugeridas para o manejo da enfermidade são o uso de híbridos resistentes e o controle químico.

De acordo com Pereira et al. (2005), os fungicidas dos grupos químicos das estrobilurinas e ditiocarbatos demonstraram controle eficiente para a mancha-branca favorecendo uma elevação na produtividade de grãos e redução no progresso da doença. O controle de muitos patógenos é realizado por meio de aplicações sistemáticas de fungicidas e bactericidas, cujo uso indiscriminado acarreta uma série de problemas, como a contaminação do ambiente, dos alimentos e dos agricultores e consumidores, seleção de populações resistentes de patógenos e diminuição de populações de organismos benéficos ou não alvos (Bettioli, 1991; Nordlund, 1996; Silva et al., 2004).

A utilização de plantas resistentes a doenças tem sido a estratégia mais eficiente e econômica (Schuelter et al., 2003; Lana et al., 2012, 2016) para evitar ou diminuir as perdas de produtividade, além de colaborar na preservação ambiental, uma vez que o uso de defensivos agrícolas muitas vezes torna-se desnecessário (Costa et al., 2003). Anualmente grande número de novos genótipos tem sido produzido nos programas de melhoramento de

milho, tornando-se imprescindível a avaliação do comportamento desses materiais em relação à resistência a doenças (Pinho et al., 2001; Brito et al., 2011).

As perdas provocadas pelas doenças foliares têm promovido amplo debate sobre estratégias de manejo que auxiliem o desenvolvimento de programas que visam o controle de patologias de maneira sustentável, principalmente no que diz respeito a redução do uso de controles químicos (Brito et al., 2013). Como alternativa ecológica, o biocontrole de fitopatógenos tem se destacado como uma forma promissora e viável, por meio da utilização de micro-organismos como agentes naturais para a proteção de plantas cultivadas (Melo & Valarini, 1995).

2.3. Biocontrole

Segundo Michereff (2001), no cenário do controle biológico, doença é o fruto de uma relação entre hospedeiro, organismos patogênicos e o ambiente, bem como os organismos não patogênicos residentes no sítio da infecção e que apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Deste modo, os componentes do biocontrole são a planta hospedeira, o patógeno e seus antagonistas, todos interagindo num sistema biológico sob a influência do ambiente. O biocontrole tem como definição clássica o controle de um micro-organismo através de outro micro-organismo (Baker & Cook, 1974; Bettiol, 1991). Já Michereff (2001) define controle biológico como a diminuição da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos.

Na agricultura sustentável recomenda-se a utilização de estratégias alternativas para minimizar os efeitos negativos das doenças no desenvolvimento das plantas através do controle biológico. A utilização de micro-organismos com potencial antagonista pode ser um mecanismo inibitório do desenvolvimento de fitopatógenos sem causar degradação ambiental (Alves et al., 2013), mantendo o equilíbrio do agroecossistema e diminuindo os danos causados pelo patógeno (Grigoletti Júnior et al., 2000).

Segundo Melo & Azevedo (1998), várias estratégias, direta ou indireta, têm sido utilizadas na obtenção do controle biológico, tal como o uso de micro-organismos do solo com potencial antagônico sobre patógenos de plantas. A introdução de antagonistas do solo em órgãos de propagação vegetativa, parte aérea das plantas e sementes são exemplos da estratégia direta (Alves et al., 2013).

Diferente do controle químico, o biocontrole não expressa seu efeito rapidamente, podendo este estar abaixo do necessário tornando imprescindível o uso de algum método de controle auxiliar, consolidando a prática de manejo integrado. O pleno sucesso do controle biológico é impedido, muitas vezes, pela falta de compreensão sobre a ecologia do micro-organismo patógeno e antagonista (Grigoletti Júnior et al., 2000) e os mecanismos de ação que mediam essas interações (Lanna Filho et al., 2010).

A seleção de antagonistas pelo teste *in vitro* permite que populações de micro-organismos sejam avaliadas rapidamente para se implantar um programa de controle biológico (Mariano, 1993). Essa estratégia apresenta-se como uma importante ferramenta no entendimento do comportamento e mecanismos de ação dos biocontroladores sobre os patógenos alvos (Silva et al., 2008). Contudo, os testes *in vitro* precisam ser validados *in vivo*, primeiramente em condições controladas em casa de vegetação e, posteriormente, nas condições de campo (Bettiol, 1991).

O termo “antagonista” refere-se à capacidade de agentes biológicos em intervir sobre os processos vitais dos fitopatógenos (Michereff, 2001). Os micro-organismos antagonistas podem apresentar um ou mais mecanismos de ação sobre os patógenos, o que constitui outro fator importante para que haja resultados positivos no emprego do controle biológico (Bettiol, 1991). Os mecanismos de controle biológico têm como base a relação antagonista entre micro-organismos tais como: competição, parasitismo, predação, amensalismo, indução de resistência, proteção cruzada e síntese de metabólitos que inibem o desenvolvimento de outro organismo (Saito et al., 2009). A seleção mais efetiva de micro-organismos antagônicos deve ser realizada com o isolamento no ambiente onde posteriormente estes organismos serão utilizados, sendo aqueles originários do filoplano os mais adequados. Contudo, antagonistas isolados em outros habitats também podem ser utilizados com êxito. No primeiro caso, os micro-organismos não patogênicos são denominados antagonistas residentes ou que ocorrem naturalmente, e no segundo, como antagonistas exógenos na cadeia alimentar (Bettiol, 1991).

De acordo com Filho et al. (2009), a investigação por micro-organismos benéficos, agentes de biocontrole, como alternativa para elevar a produtividade e melhorar o estado fitossanitário das plantas, tem ganhado destaque na pesquisa agrícola nas últimas décadas. Além disso, o uso do controle biológico objetiva a produção mais sustentável de alimentos, sem aplicação de agrotóxicos, contribuindo com a redução dos custos (Silva et al., 2013). De acordo com Souza (1993), o emprego de metabólitos bioativos na agricultura tem despertado

o interesse de ambientalistas por serem também, ao contrário dos insumos sintéticos, substâncias biodegradáveis.

Estudos têm demonstrado alguns micro-organismos como potenciais agentes antagonistas de biocontrole, destacando-se a bactéria *Bacillus subtilis* (Lanna Filho et al., 2010), diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* com destaque para *Pseudomonas cepacia* (Robbs, 1991), espécies de fungos como *Trichoderma* sp. (Maciel et al., 2012) e actinomicetos do gênero *Streptomyces* (Siqueira, 1988). Muitos micro-organismos que colonizam a rizosfera proporcionam defesas externas às plantas contra injúrias causadas por fitopatógenos, com destaque para as bactérias, que constituem o maior grupo de ocorrência no solo (Verdolin et al., 2013).

Entre as bactérias, os actinomicetos têm se destacado pela elevada capacidade em produzir importantes substâncias capazes de controlar micro-organismos fitopatogênicos (Siqueira, 1988), demonstrando o seu grande potencial antagônico (Filho et al., 2009). Na agricultura, os actinomicetos do gênero *Streptomyces*, tem controlado em nível satisfatório inúmeras doenças segundo os autores Moura e Romeiro, 1999; Coombs et al., 2004; Oliveira, 2004; Sahilah et al., 2010; Van Der Sand, 2014; Shiomi et al., 2015.

2.4. Actinomicetos

Actinomicetos são bactérias gram-positivas com alto conteúdo de guanina/citosina em seu genoma e pertencentes ao filo *Actinobacteria* (Stach et al., 2003; Nithya et al., 2012; Tortora et al., 2012; Van Der Sand et al., 2014). São aeróbicos, filamentosos, parcialmente ácido-resistentes e possuem alta diversidade morfológica (McNeil & Brown, 1994; Claessen et al, 2006; Euanorasetr et al., 2010) com crescimento bastante lento (Aghamirian & Ghiasian, 2009). Os actinomicetos produzem micélio aéreo e vegetativo, e esporos para dispersão, reprodução e sobrevivência em condições adversas (Holt et al., 1994; Batista, 2010).

Capazes de se adaptar aos mais variados ambientes, os actinomicetos vivem em diferentes nichos ecológicos, podendo ser encontrados na água, produtos alimentícios, nódulos de raízes das plantas, estrume, restos vegetais em decomposição, composto, poeira, lodo ativado e, no solo que é o seu habitat mais comum (McCarthy & Williams, 1992; Benizri et al., 2001; Silva et al., 2003; Filho et al., 2009; Gurung et al., 2009; Ogunmwonyi et al., 2010, Bizuye et al., 2013; Van Der Sand et al., 2014).

Os actinomicetos correspondem a 30% da microbiota do solo, sendo estes organismos adaptados a se desenvolver sobre substratos sólidos (Kennedy, 1999), preferencialmente em solos de pH neutro a alcalino, embora muitos cresçam em solos ácidos (Araújo, 1998). A colonização do substrato é feita pela penetração das hifas e secreção de inúmeras enzimas (McCarthy & Williams, 1992).

Alguns gêneros de actinomicetos são facultativos ou anaeróbios obrigatórios e apresentam grande diversidade metabólica podendo ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos e fototróficos (Kennedy, 1999). De acordo com Tortora et al. (2012), a morfologia dos actinomicetos em superfície assemelha-se a dos fungos filamentosos, porém, estes micro-organismos são procariontes e seus filamentos possuem um diâmetro menor. Estes micro-organismos exibem elevado grau de diversidade morfo-fisiológica e atividade bioquímica com produção de inúmeros metabólitos bioativos (Taddei et al., 2006; Suneetha et al., 2011; Barka et al., 2016). Tradicionalmente, os testes morfológicos tais como padrão de crescimento e tipos de micélios são as características mais utilizadas para definir Ordem, Gênero e espécies nesse grupo de micro-organismos, e testes bioquímicos empregando atividade enzimática são empregados para identificação de novos compostos bioativos (Barka et al., 2016). Recentemente, dados moleculares baseados no sequenciamento do gene ribossomal 16S tem assumido papel de destaque na sistemática de actinomicetos, possibilitando a redefinição de grupos e revelando novas espécies (Ventura et al., 2007; Sagova-Mareckova et al. 2015).

De acordo com Araújo (1998), os actinomicetos são reconhecidos como os principais produtores de vários metabólitos secundários, principalmente os antibióticos por causa do seu amplo espectro de ação em relação à célula alvo, com atividade contra micro-organismos e até células tumorais. Maheshwari et al. (2010) relatam que o gênero *Streptomyces* produz uma ampla diversidade de compostos bioativos incluindo moléculas com atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, inseticida, herbicida, entre outras. Segundo Filho et al. (2009) os actinomicetos têm se tornado organismos de interesse no controle biológico em razão dos diversos compostos produzidos e excretados, sobretudo antibióticos, com contribuição de 2/3 da produção total das substâncias já conhecidas (Challis & Hopwood, 2003).

Diversos metabólitos, com atividade biológica antibacteriana, pertencentes a diferentes classes como kanamicina (*S. kanamyceticus*), anfotericina B (*S. nodosus*), cloranfenicol (*S. venezuelae*), tricomicina (*S. hachijoensis*), tetraciclina (*S. rimosus*), streptomina (*S. griseus*),

eritromicina (*S. erythreus*), neomicina (*S. fradiae*), vancomicina (*S. orientalis*), rifampicina (*Amycolatopsis mediterranei*), gentamicina (*Micromonospora* sp.), abissomicina (*Verrucosisspora* sp.) têm sido isolados neste grupo de procariotos (Maheshwari, et al., 2010; Geetanjali & Jain, 2016).

Também se destacam pela capacidade em sintetizar vitaminas, substâncias inibidoras de atividade enzimática (Taguchi et al., 1993; Pereira, 2000), enzimas (Flores et al., 1997, Van Der Sand et al., 2014) e outros compostos biologicamente ativos (Pereira, 2000, Nithya et al., 2012). Entre os diversos gêneros de actinomicetos, destacam-se entre os principais sintetizadores de biomoléculas comercialmente importantes, *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora*, *Micromonospora* e *Actinoplanes* (Solanki et al., 2008; Chaudhary et al., 2013).

Diversas características associadas aos actinomicetos podem esclarecer o potencial da sua utilização como agente de biocontrole, tais como a capacidade de colonizar a superfície da planta, antibiose contra fitopatógeno e degradação de fitotoxinas (Doubou et al., 2001, Euanorasetr et al., 2010; Kaur et al., 2014), parasitismo, indução de autólise e produção de compostos tóxicos ou inibidores voláteis (Cardoso, 1978; Gava et al., 2002).

Embora existam poucos estudos disponíveis, o uso das actinomicetos no controle de doenças bacterianas de plantas tem sido realizado desde o início do século XX, sendo os resultados obtidos com o uso do gênero *Streptomyces* bastante satisfatórios (Moura & Romeiro, 1999). Os representantes mais conhecidos deste grupo são *S. griseus*, *S. aureofaciens*, *S. rimosus* e *S. avermetilis*, que sintetizam os antibióticos estreptomicina, clorotetraciclina, terramicina e a avermectina; respectivamente (Batista et al., 2010). Silva et al. (1984) destaca os actinomicetos *S. griseus*, *S. noursei*, *S. aureofaciens* e *S. griseochromogenes* pela produção dos fungicidas ciclohexamida, fungicidina, aureomicina e blasticidina.

Os actinomicetos têm demonstrado elevado potencial para biocontrole de doenças de plantas (Sahilah et al., 2010). Dentre os estudos realizados, destacam-se o controle da murcha bacteriana em plantas de tomate causada pela bactéria gram-negativa *Ralstonia solanacearum* (Moura & Romeiro, 1999; Sahilah et al., 2010), podridão em frutos de videira pelo fungo *Botrytis cinerea* (Oliveira, 2004), podridão de raiz e coroa em trigo (Coombs et al., 2004; Van Der Sand, 2014) e mancha-foliar em milho causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* (Shiomi et al., 2015). O antibiótico geldanamicina, produzido no solo por *S. hygrosopicus* var.

geldanus, responde pelo controle do fungo *Rhizoctonia solani*, agente causal da podridão radicular em diversas culturas (Rothrock & Gottlieb, 1984; Doumbou et al., 2001).

Além de produzir diversos antibióticos, os actinomicetos também produzem enzimas hidrolíticas como amilase, pectinase, celulase, lipase, protease, catalase e xilanase (Ding et al., 2004, Selvam et al., 2011; Van Der Sand et al., 2014; Silva et al., 2015). As enzimas constituem um dos grupos mais importante relacionados com a síntese de produtos biológicos de necessidade humana (Pandey et al., 1999). De acordo com Godfrey & West (1996), as enzimas são proteínas essenciais que catalisam reações bioquímicas com grande especificidade e atuam na promoção dessas reações, sem requerer condições extremas de pH, pressão e temperatura. Apesar de ocorrerem em abundância nas plantas e animais, as de origem microbiana representam excelentes fontes em razão da sua vasta diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética (Kirk et al., 2002).

Atualmente, as enzimas hidrolíticas se destacam por causa do uso em diversos processos industriais, sobretudo na área da biotecnologia, tais como na degradação de substâncias naturais, nas indústrias têxtil, alimentícia, papel, detergentes e couro (Kirk et al. 2002; Oliveira et al., 2006). O amido, a celulose e o lipídeo são substâncias presentes na matéria orgânica que podem ser decompostos por actinomicetos, gerando como subproduto moléculas de fácil assimilação por outros micro-organismos e vegetais (Moreira & Siqueira, 2006).

Os actinomicetos atuam na decomposição da matéria orgânica por causa da produção de enzimas extracelulares oriundas do metabolismo secundário (Moreira & Siqueira, 2002). Estas enzimas têm sido empregadas em inúmeros processos biotecnológicos, a exemplo da síntese de compostos industriais, hidrólise de polímeros, biorremediação de solos, dentre outros (Rodrigues, 2006). Em razão da sua alta plasticidade, estes micro-organismos constituem um bom alvo para a produção desses compostos de interesse não apenas para o setor agrícola, mas também para as indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e de papel (Goodfellow et al., 1988). Assim sendo, a bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas se mostra como um trabalho fundamental para a busca de potenciais produtores (Luz et al., 2016).

Entre os actinomicetos estudados, o gênero *Streptomyces* é o de maior importância biotecnológica por serem responsáveis pela produção de diversas enzimas de aplicação industrial (Ding, 2004). Em razão da capacidade de degradar diversos substratos, estes micro-

organismos possuem elevado potencial biotecnológico em virtude dos perfis enzimáticos apresentados e podem ser alvo de futuros estudos na busca de novas fontes para produção e exportação de enzimas (Zimmer et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Microbiologia e Bioquímica do Solo, Fitopatologia e Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, no município de Sete Lagoas, MG, e no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, no município de Pedro Leopoldo, MG.

3.1. Reativação dos isolados

Um total de 98 isolados da Coleção de Micro-organismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-MS), previamente identificados como actinomicetos com base em sua morfologia de crescimento, foram utilizados nesse estudo (Tabela 1).

Para reativação dos isolados, efetuou-se a transferência de pequenos fragmentos da cultura preservada em óleo mineral estéril para placa de Petri contendo meio Ágar Glicerol-Asparagina – AGA [1 g/L de L-asparagina, 10 g/L de glicerol, 1 g/L de KH_2PO_4 , 15 g/L de ágar, 1 mL/L de solução de micronutrientes (0,1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, qsp 100 mL de água deionizada)] (Pridham & Lyons, 1961; Shirling & Gottlieb, 1966), suplementado com 0,03 g/L do fungicida ciclohexamida, seguido de incubação por um período de 14 dias à temperatura de 28 °C. O método de esgotamento por estrias foi empregado para avaliar a pureza das culturas dos isolados de actinomicetos.

Em seguida uma colônia isolada foi crescida em placa contendo meio AGA, conforme descrito anteriormente, sendo uma nova alíquota congelada e outra repicada em tubo contendo o mesmo meio de cultura, e mantido inclinado para posterior utilização nas etapas de caracterização morfológica, molecular e bioquímica.

Os isolados fitopatogênicos de *P. ananatis*, identificados como CMPC 40 e CMPC 105, foram cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo e encontravam-se conservados à temperatura de – 20 °C em meio Batata Dextrose Ágar – BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g de ágar, por litro) sob óleo mineral esterilizado. Para a ativação das estirpes, pequenos fragmentos da cultura de *P. ananatis* foram transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura BDA com posterior incubação a 30 °C por 24 horas.

Tabela 1. Relação dos isolados de actinomicetos selecionados para estudo: origem, ano de coleta e identificação.

Origem	Ano de coleta	Identificação
Solo do cerrado com alto nível de fosfato/Sete Lagoas	2000	ACSL 1, 2, 8
Experimento 3/Jaíba - solo	2001	AE ₃ J 57, 64, 66, 73, 76
Solo do cerrado/Sete Lagoas	2001	ACT 64, 80, 83, 85, 86, 93, 94, 115
Solo do cerrado/Sete Lagoas	2001	A 12, 16
Carrasco/Jaíba - solo	2001	ACJ 1, 17, 24, 26, 27, 29
Mata seca/Jaíba - solo	2001	AM _S J 36, 39, 43, 45
Reserva legal/Jaíba -solo	2001	AR _L J 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55
Solo do cerrado/Araquis	2002	A 346, 358, 363, 364
Solo orgânico/Sete Lagoas	2002	A 432, 448, 449, 450, 453, 457, 465, 470
Solo do cerrado - CD/Sete Lagoas	2003	A 402, 403, 404, 405, 409, 412, 413
Solo do cerrado- Embrapa/Sete Lagoas	2004	A 474, 485, 490, 495, 505, 509, 517
Solo rizosférico de milho/Sete Lagoas	2004	AC 7, 18, 25, 27, 50, 53, 54, 64, 67, 73, 77, 82, 91
Fazenda Santa Rita/ Sete Lagoas - solo	2006	ACT 627, 641, 645
Fazenda Santa Rita/ Sete Lagoas - solo	2007	AE _p FSR II 5, 29, 31, 38, 66
Composto/Sete Lagoas	2013	K10A10, K18A18
Composto/Papagaios	2013	KACP 15, 35
Solo do cerrado - Embrapa/Sete Lagoas	2014	LD 1, 3, 6, 13, 16, 18, 22, 23, 27, 28, 39
Composto/Capim Branco	2015	ACT F1-1

3.2. Caracterização morfológica de actinomicetos

3.2.1 Macromorfologia

Para análise macromorfológica, os isolados foram submetidos ao exame macroscópico de acordo com Shirling & Gottlieb (1966). Os isolados foram cultivados em meio AGA a 28 °C por 14 dias, em placas de Petri. Foram considerados como prováveis actinomicetos

aqueles micro-organismos que possuíam características como colônia pequena, ressecada e aderida ao ágar (Hungria & Silva, 2011). A coloração dos micélios vegetativo (reverso da placa) e aéreo, além da presença de pigmentos solúveis (anverso da placa) foram avaliadas em todos os isolados considerados prováveis actinomicetos.

3.2.2 Micromorfologia

Para a análise micromorfológica foi utilizada a técnica de microcultivo (Holt et al., 1989) em cada um dos isolados previamente considerados como prováveis actinomicetos na visualização macromorfológica. O microcultivo foi montado em placas de Petri de vidro contendo no seu interior uma lâmina de microscópio e ao seu lado um chumaço de algodão. Cada conjunto foi embalado e esterilizado em autoclave por 30 min à 121 °C. Um cubo de aproximadamente 1 cm³ de meio de cultura AGA foi cortado e colocado sobre a lâmina contida no interior da placa. Inoculou-se o isolado com o auxílio de alça de platina em todos os lados do cubo, posteriormente coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umedecido com água ultrapura esterilizada e a placa incubada em estufa por 14 dias a 28 °C. Após o período de incubação, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina microscópica estéril contendo uma gota de lactofenol de Amann (ácido láctico, fenol cristalizado, glicerol e água na proporção de 1:1:1:1), sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. Após o preparo, as lâminas foram avaliadas quanto à presença de cadeia de esporos e morfologia ao microscópio óptico Leica DFC 490 (Leica, Alemanha) em aumento de 1000X e fotografadas.

3.3. Caracterização molecular de actinomicetos

3.3.1. Extração de DNA

Os isolados caracterizados macromorfolologicamente como actinomicetos foram cultivados em placas de Petri contendo meio AGA a 28 °C por 14 dias. Depois desse período, as colônias foram removidas do meio sólido e maceradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido. Em seguida, aproximadamente 0,5 g de material pulverizado de cada isolado foi recolhido em microtubo de 2 mL, previamente identificado. Foi adicionado 1 mL

de solução salina 0,8% (m/v), seguida de homogeneização vigorosa e centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos.

O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspendido em 567 μ L de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA; pH 8,0), e posteriormente adicionados 30 μ L de SDS 10% (m/v) e 3 μ L de proteinase K (20 mg/mL). As amostras foram homogeneizadas vigorosamente e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 100 μ L de NaCl 5 M em cada amostra e homogeneizadas vigorosamente. Em seguida, foram adicionados 80 μ L de solução CTAB/NaCl 10% (m/v), sendo as amostras homogeneizadas vigorosamente e submetidas à incubação por 10 minutos a 65 °C. Após esta fase, foram adicionados 600 μ L de clorofórmio/octanol (24:1), seguido de homogeneização por inversão por 5 minutos e centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa (superior) foi transferida para novo microtubo contendo 600 μ L de clorofórmio/octanol (24:1), seguido novamente de homogeneização por inversão durante 5 minutos e centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos.

A fase aquosa foi transferida para microtubo de 1,5 mL e acrescida de 600 μ L de isopropanol gelado para precipitação do DNA. A solução foi incubada por 30 minutos a -20 °C e centrifugada a 14.000 rpm por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100 μ L de etanol 70% (v/v) gelado, sendo as amostras centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em centrífuga à vácuo por 10 minutos. Por fim, o precipitado foi ressuspendido em 50 μ L de tampão TE com RNase (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM; RNase A 4 μ g/mL; pH 8,0) e as amostras armazenadas a -20 °C.

Para avaliar a qualidade, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) durante 1 hora a 100 V em tampão TAE 1X (10 mM Tris, 20 mM ácido acético e acetic 1mM EDTA pH 8,0). O gel foi corado com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) diluída 3.300X em NaCl 0,1 M por 20 minutos. A visualização das bandas de DNA foi realizada em transiluminador sob luz ultravioleta e o gel fotografado no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, Rochester, NY, USA). A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro ND-1000 UV/VIS (NanoDrop Technologies, EUA) e as amostras diluídas para a concentração de 10 ng/ μ L.

3.3.2 Amplificação do gene 16S rRNA

Para amplificação do gene 16S rRNA dos isolados de actinomicetos foram utilizados os *primers* 8F e 1492R (Tabela 2). A reação de PCR consistiu de 2 μL de DNA (10 ng/ μL); 2 μL tampão de reação 10 X (Kapa Biosystems, EUA); 1,5 μL de dNTP's (2,5 mM cada); 4 μL de DMSO 20% (v/v); 1 μL de cada *primer* (10 μM); 0,2 μL de Taq DNA Polimerase 5 U μL^{-1} (Kapa Biosystems, EUA) e 8,3 μL de água ultrapura. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador modelo Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers (Applied Biosystems, EUA). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 56 °C e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72 °C, com uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Posteriormente, 5 μL do produto da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) durante 1 hora a 100 V em tampão TAE 1X corado com solução de Gel Red™ (Biotium, EUA) diluída 3.300X em 0,1 M NaCl por 20 minutos. Em seguida foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, EUA).

3.3.3 Sequenciamento de DNA

Para sequenciamento do gene 16S rRNA, 15 μL do produto da reação de PCR foram purificados com a adição de 1,5 μL da enzima Exo-Sap (GE HealthCare, USA) e incubação a 37 °C por 30 minutos, seguido de 80 °C por 15 minutos. As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se 3,0 μL do DNA purificado (entre 50 a 100 ng), 0,5 μL Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, EUA), 1,75 μL do tampão 5X (Applied Biosystems, EUA), 1 μL de *primer* (10 μM) e 3,75 μL de água ultrapura. As reações foram incubadas em termociclador a 96 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes. Nessa etapa, foram utilizados os *primers* 8F e 1492R, além dos oligonucleotídeos internos 515F e 902R, descritos na Tabela 2.

As reações de sequenciamento foram purificadas pela adição de 5 μL de EDTA 125 mM e 60 μL de etanol absoluto, homogeneizadas e dispostas no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionados 60 μL de etanol 70% (v/v), sendo as amostras novamente centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi

descartado e as amostras centrifugadas invertidas até 300 rpm com aceleração e desaceleração igual a 1. Após serem centrifugadas, foram dispostas para secagem em estufa a 65 °C por 3 minutos. As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems, EUA), desnaturadas no termociclador a 95 °C por 5 minutos e mantidas no gelo até a injeção no sequenciador.

As amostras foram analisadas no sequenciador modelo ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem, EUA), e as sequências de nucleotídeos alinhadas com o programa *Sequencher* 4.1 para geração da sequência consenso de cada isolado. Para identificação molecular dos isolados, as sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por meio do algoritmo BLAST N (Altschul et al., 1997).

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.

Primer	Sequência (5'-3')	Referência
8F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Turner et al., 1999
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Turner et al., 1999
515F	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	Turner et al., 1999
902R	GTC AAT TCI TTT GAG TTT YAR YC	Hodkinson & Lutzoni, 2009

Y: representa as bases nitrogenadas Citosina ou Timina.

M: representa as bases nitrogenadas Adenina ou Citosina.

R: representa as bases nitrogenadas Adenina ou Guanina.

I: representa a base inosina, podendo parear com qualquer nucleotídeo.

3.3.4. Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada a partir das sequências da região do 16S rRNA pelo método de neighbour-joining, utilizando o modelo evolutivo Tamura 3 parameter com 1000 *bootstraps*, com o programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Foram utilizadas sequências de “isolados tipo” provenientes de coleções de culturas internacionais para comparação, sendo a espécie *Bacillus lentus* utilizada como *outgroup* - código NCIMB 8773 e acesso GenBank AB021189.

3.4. Caracterização enzimática de actinomicetos

Os isolados caracterizados molecularmente como actinomicetos foram avaliados quanto à capacidade de produção das enzimas amilase, celulase e lipase por testes de atividade enzimática em meio sólido.

3.4.1 Produção de amilase

A produção de amilase foi testada conforme descrito por Coon et al. (1957), com alteração da concentração de amido para 6,6 g/L. Os isolados de actinomicetos foram inoculados na forma de *spots* e em triplicata no meio de cultura ágar amido (6,6 g/L de amido solúvel, 0,5 g/L de cloreto de sódio, 3 g/L de extrato de carne, 1 g/L de peptona caseína, 15 g/L de ágar; pH 7,0). As culturas foram incubadas a 28 °C por 10 dias, sendo adicionados 10 mL de solução diluída de lugol (5 g/L de iodo, 10 g/L de iodeto de potássio) em cada placa. A produção da enzima amilase foi detectada pela descoloração do meio, com formação de zona amarela clara em torno da colônia, em contraste com a coloração azul resultante da reação do amido com o iodo.

3.4.2 Produção de celulase

A produção de celulase foi avaliada utilizando meio de cultura suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (3 g/L de NaNO₃, 1 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de MgSO₄, 0,5 g/L de KCl, 10 mg/L de FeSO₄.7H₂O, 10 g/L de CMC, 15 g/L de ágar; pH 7,0), conforme Lewis (1988). Os isolados de actinomicetos foram inoculados nesse meio na forma de *spots*, em triplicata e incubados a 28 °C por 10 dias. Após a incubação, foram adicionados 10 mL de solução de vermelho congo a 0,5% (m/v) em cada placa, deixando-se agir por 15 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso da solução foi descartado e 10 mL de solução de NaCl 1 M foram adicionados, deixando-se agir por 30 minutos sob temperatura ambiente. A produção da enzima celulase foi detectada pela descoloração do meio, formando uma zona alaranjada em torno da colônia, em contraste com a coloração vermelha resultante da reação da celulose com o corante vermelho congo.

3.4.3 Produção de lipase

A produção de lipase foi testada de acordo com Savitha et al. (2007) utilizando meio de cultura com a seguinte composição: 5 g/L peptona, 1 g/L de extrato de levedura, 4 g/L de cloreto de sódio, 15 g/L de ágar, 31,25 mL/L de óleo de oliva, 0,01 g/L de rodamina B; pH 7,0. Os isolados de actinomicetos foram inoculados nesse meio na forma de *spots*, em triplicata e incubados a 28 °C por 72 horas. Após o período de incubação, as culturas foram expostas à radiação ultravioleta para observar a formação de halos de coloração azul em torno das colônias, que é o parâmetro indicativo da presença da enzima lipase (Colen, 2006).

3.4.4 Índice enzimático

Além da análise qualitativa, as atividades hidrolíticas das enzimas amilase, celulase e lipase foram estimadas semiquantitativamente através do índice enzimático (IE) conforme a seguinte equação: $IE = DH/DC$, sendo DH o diâmetro em mm do halo de hidrólise e DC o diâmetro em mm da colônia dos actinomicetos (Stamford et al., 1998; Silva et al., 2015). Os diâmetros das colônias e halos de hidrólise foram medidos com paquímetro (mm) posicionado no reverso das placas de Petri.

3.5. Antibiograma

O teste *in vitro* para testar a sensibilidade ou resistência da bactéria *P. ananatis* a agentes antimicrobianos foi realizado conforme o método Kirby-Bauer de difusão a partir de disco de papel de filtro disposto na superfície do meio de cultura (Bauer et al., 1966), segundo a padronização do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1990). Os discos contendo antibiótico (CECON, Brasil) tiveram a sua qualidade controlada com as seguintes cepas bacterianas padronizadas: *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923, *Escherichia coli* - ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853 e *Enterococcus faecalis* - ATCC 33186 (Martinez et al., 1996).

Inicialmente, duas estirpes fitopatogênicas de *P. ananatis*, identificadas como CMPC 40 e CMPC 105, foram inoculadas em meio líquido TSB (17 g/L de peptona de caseína, 3 g/L de peptona de soja, 2,5 g/L de glicose, 5 g/L de cloreto de sódio, 2,5 g/L de fosfato

dipotássico) e incubadas a 30 °C por 24 horas, com agitação constante de 150 rpm. Em seguida, os micro-organismos foram repicados por esgotamento em meio de cultura BDA e novamente incubados a 30 °C por 24 horas. Colônias das estirpes CMPC 40 e CMPC 105 foram selecionadas após essa última etapa de incubação e transferidas para tubos com solução salina 0,85% (m/v) esterilizada. Os inóculos foram ressuspensos e ajustados até atingirem a turvação correspondente a escala 0,5 MacFarland. A escala de McFarland representa concentrações específicas de CFU/mL e foi projetada para estimar concentrações de bactérias Gram-negativas sendo seus padrões rotulados de 0,5 a 10 (Sutton, 2006).

Posteriormente, o conteúdo das soluções foi espalhado em toda a superfície das placas de Petri contendo meio de cultura BDA com o auxílio de *swabs* esterilizados. Os discos contendo antibiótico foram dispostos em posições pré-determinadas e equidistantes sobre a superfície do meio semeado, sendo as placas incubadas a 30 °C por 48 horas. Após o período de incubação, realizou-se a leitura da atividade antimicrobiana que consistiu na mensuração dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento dos micro-organismos expostos aos antimicrobianos. Adotou-se o diâmetro do halo de inibição convencionado por Matura (2004) para classificação do grau de atividade antimicrobiana, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Classificação do grau de atividade antimicrobiana em função do diâmetro dos halos de inibição obtidos nos ensaios de atividade biológica.

Grau de atividade antimicrobiana	Diâmetro dos halos de inibição (mm)
Ausente	0
Baixa	7-10
Moderada	11-14
Alta	>14

3.6. Avaliação da atividade antibacteriana dos isolados de actinomicetos frente à *P. ananatis*

3.6.1 Seleção primária dos isolados de actinomicetos em meio sólido

Para o teste de atividade antimicrobiana, 5 µL de suspensão de propágulos dos isolados de actinomicetos foram depositados equidistantemente nas placas de Petri contendo meio AGA e incubadas por 14 dias a 28 °C. Após o período de incubação, as placas de Petri foram tratadas com e sem irradiação ultravioleta (UV) durante 15 minutos para a inativação

dos actinomicetos e avaliação da atividade antimicrobiana dos micro-organismos e metabólitos secundários difundidos no meio sólido quando expostos ou não a irradiação UV. Posteriormente, as colônias foram recobertas por uma alíquota de 5 mL de meio semi-sólido de caldo triptona de soja - TSB (17 g/L de peptona de caseína, 3 g/L de peptona de soja, 2,5 g/L de glicose, 5 g/L de cloreto de sódio, 2,5 g/L de fosfato dipotássico e 3 g/L de ágar) contendo células de *P. ananatis* conforme método de sobrecamada (Williams, et al., 1983), sendo incubadas por 48 horas a 28 °C.

Passado o período de incubação, observou-se a produção ou não de zonas de inibição indicativas da atividade antimicrobiana. Foi considerado como zona de inibição qualquer halo produzido indiferente do seu diâmetro, sendo os mesmos medidos com auxílio de paquímetro (mm) posicionado no reverso das placas de Petri. Os isolados de actinomicetos com atividade antimicrobiana considerada moderada e alta (Tabela 3) para as duas estirpes de *P. ananatis* foram selecionados para os testes de seleção secundária da atividade antimicrobiana que consistiu na avaliação de metabólitos em meio líquido.

3.6.2 Seleção secundária dos isolados de actinomicetos em meio líquido

Para avaliação de compostos antimicrobianos, os isolados de actinomicetos selecionados na seleção primária foram inoculados separadamente em dois meios de cultura: ISP-2 (4 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de extrato de malte, 4 g/L glicose e pH 7,2) e M1 (10 g/L de glicose, 10 g/L de farinha de soja, 5 g/L de cloreto de sódio, 1 g/L carbonato de cálcio; pH 7,0) (Shirling & Gottlieb, 1966). Inicialmente, os actinomicetos selecionados foram pré-inoculados em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido ISP-2. Os frascos foram mantidos sob agitação constante de 180 rpm, a 28 °C por 48 horas. Após esse período, uma alíquota de 2 mL de suspensão de cada isolado selecionado foi transferida para erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios líquidos ISP-2 ou M1.

A fermentação foi mantida em agitação constante de 180 rpm por 24, 48, 72, 96 e 120 horas a 28 °C para ambos os meios líquidos. A cada 24 horas de cultivo, o meio fermentado foi centrifugado a 4.000 rpm durante 15 minutos para separação da massa celular. O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico de 50 mL e mantido em ultrafreezer a - 80 °C. A partir deste sobrenadante foram selecionados, através do método de difusão de disco (Bauer et al., 1966), os tempos e respectivos meios líquidos que apresentaram formação de

zonas de inibição indicativas de antibiose. Para isso, discos de papel de 6 mm de diâmetro foram umedecidos com 20 µL do sobrenadante e transferidos para placas cobertas com as estirpes fitopatogênicas de *P. ananatis* que foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Passado o período de incubação, avaliou-se a produção ou não de zonas de inibição, sendo considerado como zona de inibição qualquer halo produzido, indiferente do seu diâmetro.

Determinado o meio fermentativo e o período de incubação onde foi detectada maior atividade antimicrobiana, o meio de cultura contendo metabólitos foi liofilizado e ressuspendido em 5 mL de água ultrapura estéril.

3.6.3 Análise de agentes microbianos produzidos por isolados de actinomicetos

3.6.3.1 Extração com ácido tricloroacético (TCA)

Para determinar os potenciais agentes antimicrobianos existentes nas amostras selecionadas na etapa anterior, foi realizada a extração com ácido tricloroacético (TCA). Para isso, uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi transferida para um tubo cônico de 15 mL contendo 9 mL de solução aquosa de TCA 5% (v/v). A mistura foi submetida à agitação em agitador mecânico horizontal (250 ciclos/min) por 5 minutos. Em seguida, 2 mL da mistura foram transferidos para microtubos e centrifugados a 14.000 rpm por 12 minutos a 4 °C. Os extratos foram filtrados em membrana de nylon com poro de 0,22 µm e diâmetro de 13 mm em frascos de vidro para injetor automático e analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM/EM) com fonte de ionização *electrospray* (ESI em modo positivo).

3.6.3.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas

O sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência utilizado foi composto por bomba binária com injetor automático acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo com fonte ESI, sistema RRLC 1200 (Agilent Technologies, EUA) e sistema API 5000 (Applied Biosystems, EUA), sendo aquisição de dados realizada pelo software Analyst[®] versão 1.5.1 (Agilent Technologies, EUA).

As análises dos extratos foram realizadas de acordo com as seguintes condições cromatográficas: coluna Zorbax Eclipse XDB C18, 50 x 4,6 mm, 1,8 µm; volume de injeção de 10 µL; temperatura da coluna de 35 °C; fase móvel A – 0,2% (v/v) de ácido heptafluorobutírico em água deionizada; fase móvel B – acetonitrila; fluxo de 0,6 mL/min e sistema gradiente (tempo inicial – 90% A; 2,0 min – 50% A; 2,5 min – 50 % A; 3,0 min – 90% A e 6 min – 90% A). As condições utilizadas na espectrometria de massas foram: modo de ionização *electrospray* +, temperatura da fonte de 650 °C, *ion spray voltage* (IS) de 5500 V, *collision gas* (CAD) 6, *curtain gas* (CUR) 20, *ion source gas* 1 (GS1) 50 e *ion source gas* 2 (GS2) 50.

Os analitos pesquisados foram do grupo dos aminoglicosídeos (espectinomicina, estreptomicina, dihidroestreptomicina, amicacina, higromicina, apramicina, gentamicina, neomicina, tobramicina, canamicina), das tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina) e das fluorquinolonas (ciprofloxacina e enrofloxacina).

3.7. Análise estatística

Todos os ensaios foram dispostos segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra. Os ensaios de antibiograma foram analisados segundo esquema fatorial 2 x 25, sendo duas estirpes de *P. ananatis* e 25 antibióticos. Os ensaios de eficiência da atividade antibacteriana dos isolados de actinomicetos contra duas estirpes da bactéria *P. ananatis* foram analisados segundo esquema fatorial 2 x 69, sendo duas estirpes de *P. ananatis* e 69 isolados de actinomicetos. Os ensaios de avaliação temporal da atividade antibacteriana nos líquidos metabólitos dos isolados de actinomicetos foram analisados segundo esquema fatorial 2 x 3 x 5, sendo dois meios de cultivo, três isolados de actinomicetos e 5 tempos de incubação. Os resultados de cada ensaio foram analisados individualmente e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$), os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott para os ensaios de antibiograma e eficiência da atividade antibacteriana dos isolados de actinomicetos contra duas estirpes da bactéria *P. ananatis* e pelo teste de Tukey para os ensaios de avaliação temporal da atividade antibacteriana nos líquidos metabólitos, a 5% de probabilidade, por meio do programa SISVAR[®] 5.3 (Ferreira, 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização morfológica de actinomicetos

A avaliação das características morfológicas dos 98 isolados indicou que apenas 69 foram identificados como actinomicetos após cuidadosa análise macroscópica. Entre as características observadas neste estudo, encontra-se a produção de micélio, o que proporcionou uma aparência pulverulenta e crescimento radial, permitindo a diferenciação das demais bactérias. Este grupo de micro-organismos apresenta ampla diversidade morfológica, sendo seu crescimento caracterizado pela presença de hifas ramificadas formando um extenso micélio vegetativo e de um micélio aéreo altamente diferenciado com posterior formação de esporos (Willey et al., 2006; Ventura et al., 2007; Flårdh & Buttner, 2009). Tais características também foram relatadas por Fischer et al. (2003) em estudo de caracterização morfológica e cultural de *Streptomyces* spp. isolados da batata (*Solanum tuberosum* L.). De acordo com Williams et al. (1989), a distinção entre o gênero *Streptomyces* e outros actinomicetos pode ser realizada através da caracterização morfológica. Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Streptomyces* possuem crescimento relativamente mais lento que outras bactérias e o micélio vegetativo pode apresentar uma variedade de cores (Euanorasetr et al., 2010).

Nesse estudo, todas as morfoespécies produziram micélio vegetativo no meio AGA, com variação evidente na coloração e desenvolvimento dos micélios e liberação de pigmentos (Figura 1). A liberação de pigmentos solúveis em meio AGA foi detectada em 50,7% (35) dos isolados caracterizados como actinomicetos. As colorações dos pigmentos liberados variaram de amarelo (28,6%), marrom claro (40,0%), marrom escuro (28,6%) à preto (2,8%). Os actinomicetos são notavelmente produtores de uma gama de pigmentos específicos, oriundos do metabolismo secundário, que exibem várias atividades biológicas, além de citotoxicidade (Margalith, 1992; Duran et al., 2002). Tais pigmentos são comumente sintetizados a partir de melaninas, carotenóides, flavina e fenazina (Margalith, 1992).

Os isolados de actinomicetos apresentaram alta diversidade em relação às características macromorfológicas (Tabela 4). Rahman et al. (2011) avaliaram a atividade antibacteriana de actinomicetos isolados de solos da Índia e observaram que tons variados de cinza predominaram entre as estirpes, seguido dos tons de marrom, branco, laranja e

vermelho. Esses autores também observaram que a composição dos nutrientes utilizados em cada meio de cultura influenciou a coloração do micélio aéreo, enquanto que o local de isolamento do micro-organismo não apresentou nenhuma influência nesse fenótipo.

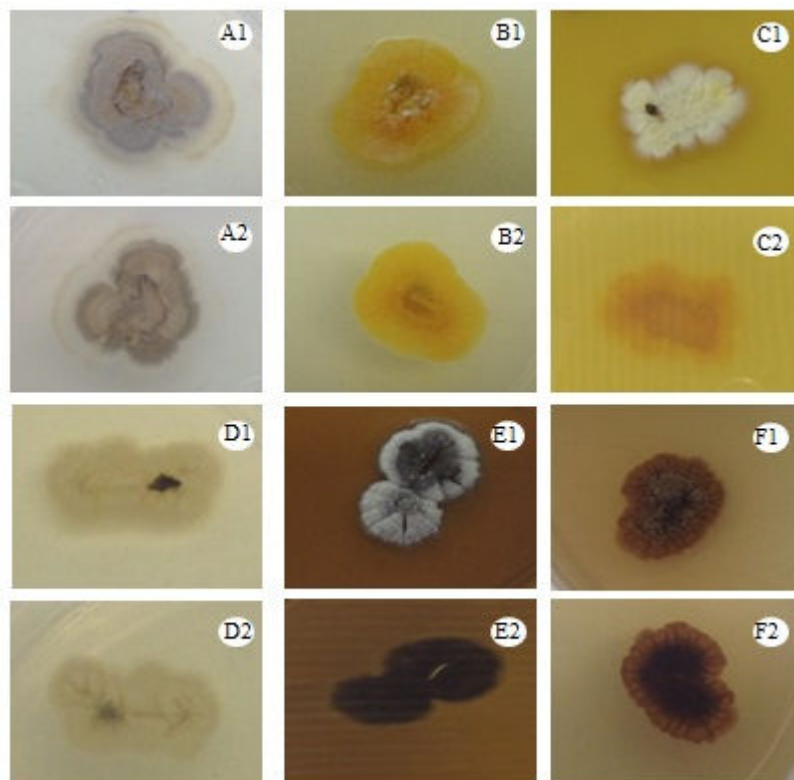


Figura 1 – Características macromorfológicas e culturais dos isolados representativos de actinomicetos após cultivo em meio AGA por 14 dias a 28 °C. A1 à F1: imagem do anverso da placa (micélio aéreo e pigmento); A2 à F2: imagem do verso da placa (micélio vegetativo). (A) AE_pFSRII 5; (B) A 346; (C) ACJ 26; (D) ACSL 8; (E) KACP 35; (F) AE_pFSRII 31.

As características micromorfológicas dos actinomicetos, previamente identificados na macromorfologia, foram determinadas após observação das lâminas preparadas com lactofenol de Amann (Tabela 4). A micromorfologia revelou diferenciação na estrutura morfológica das cadeias de esporos, sendo 10,2% reta (Figura 2A), 29,0% *retinaculum-apertum* (Figura 2B), 27,5% espiral (Figura 2C) e 33,3% flexível (Figura 2D). De acordo com Williams et al. (1989), a caracterização microscópica do gênero *Streptomyces* pode ser realizada através da microscopia do micélio aéreo, que forma cadeia de esporos que podem ser retos, flexuosos, em forma de espirais com uma ou duas voltas ou longos espirais.

Tabela 4. Características morfológicas dos isolados de actinomicetos obtidos de amostras de solo e sistema de compostagem pertencentes à Coleção de Micro-organismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF- MS).

Isolado	Características macromorfológicas			Micélio vegetativo	Pigmentos	Características micromorfológicas
	Micélio aéreo		Uniforme			Tipo da cadeia de esporos
	Borda	Centro				
A 517			Bege	Bege	-	Reta
AR ₁ J 53			Branco	Creme	-	<i>Retinaculum-apertum</i>
ACSL 2	Amarelo	Creme		Creme	-	Espiral
LD 16	Branco	Bege		Creme	-	Espiral
A 364			Cinza	Marrom escuro	-	Flexível
ACT 83			Creme	Creme	Amarelo	<i>Retinaculum-apertum</i>
LD 13			Marrom escuro	Marrom escuro	-	<i>Retinaculum-apertum</i>
ACT 80			Cinza	Marrom escuro	Marrom escuro	Reta
ACT 115			Branco	Marrom claro	Marrom claro	Espiral
A 363	Branco	Bege		Creme	-	Espiral
AE _p FSRII 31	Marrom claro	Marrom escuro		Marrom escuro	Marrom claro	Flexível
AE _p FSRII 38	Cinza	Branco		Bege	-	Flexível
LD 27			Cinza	Bege	Marrom claro	<i>Retinaculum-apertum</i>
A 470	Cinza	Marrom claro		Marrom	-	Flexível
ACJ 1	Branco	Bege		Branco	-	<i>Retinaculum-apertum</i>
A 450			Creme	Creme	Amarelo	Flexível
ACJ 17	Rosa	Branco		Bege/Rosa	-	Espiral
AR ₁ J 49	Branco	Cinza		Marrom	-	<i>Retinaculum-apertum</i>
ACSL 1	Cinza	Amarelo		Bege	-	<i>Retinaculum-apertum</i>
A 404	Amarelo	Creme		Creme	-	Espiral
LD 18			Cinza	Marrom escuro	Marrom escuro	Reta
A 448			Branco	Bege	Marrom claro	Espiral

(-) pigmento ausente.

Tabela 4. Continuação.

Isolado	Características macromorfológicas			Micélio vegetativo	Pigmentos	Características micromorfológicas
	Micélio aéreo		Uniforme			Tipo da cadeia de esporos
	Borda	Centro				
A 346			Amarelo ocre	Amarelo ocre	-	Reta
AM _S J 45			Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro	Espiral
AE ₃ J 76			Branco	Marrom escuro	Amarelo	Flexível
KACP 35	Cinza claro	Cinza escuro		Marrom escuro	Marrom escuro	Reta
A 16			Creme	Creme	-	Reta
A 453	Branco	Bege		Creme	-	Espiral
ACT 641			Bege	Marrom claro	Marrom claro	<i>Retinaculum-apertum</i>
LD 1			Branco	Preto	Preto	<i>Retinaculum-apertum</i>
A 432	Cinza	Marrom escuro		Marrom	Marrom claro	Espiral
AE _p FSRII 5			Cinza	Marrom claro	-	Espiral
A 12			Marrom claro	Marrom escuro	Marrom claro	Flexível
A 485	Marrom claro	Marrom escuro		Marrom	Marrom escuro	<i>Retinaculum-apertum</i>
AE ₃ J 66	Branco	Bege		Creme	-	Espiral
ACT 93	Marrom/roxo	Cinza escuro		Marrom escuro	-	<i>Retinaculum-apertum</i>
ACJ 29	Branco	Bege		Creme	-	Espiral
AR _L J 51			Marrom claro	Marrom claro	Amarelo	<i>Retinaculum-apertum</i>
AE _p FSRII 29			Marrom escuro	Marrom escuro	Marrom claro	<i>Retinaculum-apertum</i>
AM _S J 43	Marrom claro	Marrom escuro		Marrom	Marrom escuro	<i>Retinaculum-apertum</i>
AR _L J 48			Marrom	Marrom	Marrom escuro	<i>Retinaculum-apertum</i>
LD 23	Cinza	Branco		Marrom claro	Marrom claro	Flexível
AR _L J 52	Branco	Marrom claro		Marrom claro	Marrom claro	Flexível
ACSL 8	Branco	Bege		Bege	-	Flexível
AM _S J 36	Marrom claro	Marrom escuro		Marrom	Marrom escuro	<i>Retinaculum-apertum</i>

(-) pigmento ausente.

Tabela 4. Continuação.

Isolado	Características macromorfológicas			Micélio vegetativo	Pigmentos	Características micromorfológicas
	Micélio aéreo					Tipo da cadeia de esporos
	Borda	Centro	Uniforme			
LD 6			Marrom escuro	Marrom escuro	-	<i>Retinaculum-apertum</i>
A 490	Branco	Amarelo		Creme	-	Flexível
ACJ 26			Branco	Amarelo ocre	Amarelo	Espiral
A 495	Cinza	Amarelo		Bege	-	Flexível
A 509	Cinza	Bege		Branco	-	<i>Retinaculum-apertum</i>
A 457			Bege	Bege	-	Flexível
A 449			Branco	Marrom escuro	Amarelo	Flexível
ACT 85			Cinza	Marrom escuro	Marrom escuro	Reta
AE _p FSRII 66	Branco	Cinza		Marrom claro	Marrom escuro	Flexível
ACT F1-1			Creme	Creme	-	Flexível
LD 22			Branco	Marrom escuro	Amarelo	Flexível
AC 64			Marrom claro	Marrom claro	Amarelo	<i>Retinaculum-apertum</i>
AC 25			Creme	Marrom claro	-	Flexível
AC 82			Bege	Bege	-	Espiral
AC 53			Bege	Bege	-	Espiral
AC 54			Amarelo ocre	Amarelo ocre	-	Flexível
AC 7	Branco	Bege		Creme	-	Espiral
AC 91			Branco	Marrom escuro	Amarelo	Flexível
AC 67	Cinza	Marrom		Marrom escuro	Marrom claro	Flexível
AC 27			Creme	Creme	-	Espiral
AC 18			Creme	Creme	Amarelo	<i>Retinaculum-apertum</i>
AC 77			Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro	Flexível
AC 50			Marrom	Marrom	Marrom escuro	Flexível
ACT 64			Bege	Bege	Marrom claro	Espiral

(-) pigmento ausente.

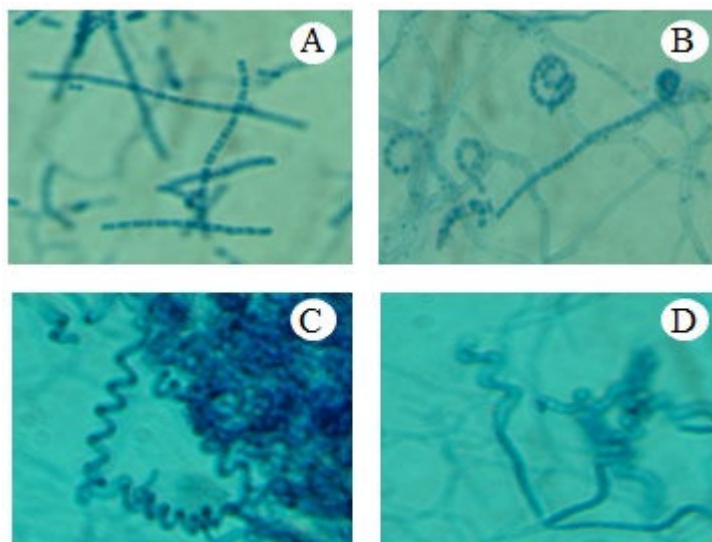


Figura 2 – Características micromorfológicas da cadeia de esporos dos isolados representativos de actinomicetos após cultivo em meio AGA por 14 dias a 28 °C. **(A)** cadeia reta; **(B)** cadeia *retinaculum-apertum*; **(C)** cadeia em espiral; **(D)** cadeia flexível. Aumento de 1000 X.

4.2. Caracterização molecular de actinomicetos

As análises moleculares permitiram a identificação dos isolados a partir do sequenciamento de DNA da região 16S rRNA, com valores de similaridade entre 98 e 100% em relação às sequências depositadas no Genbank (Tabela 5) e E-value igual a 0. Todas as 69 estirpes previamente caracterizadas morfológicamente como actinomicetos pertenceram ao Filo *Actinobacteria*, sendo 82,6% do gênero *Streptomyces*, 10,1% do gênero *Amycolatopsis* e 7,3% do gênero *Kitasatospora*.

Em um estudo que avaliou a distribuição de actinomicetos em diferentes tipos de solo do Japão, Suzuki *et al.* (1994) afirmaram que mais de 50% dos isolados identificados foram representados pelo gênero *Streptomyces*. Resultados semelhantes foram observados entre os isolados de amostras de solo de uma área florestal na Tailândia (Chanthasena & Nantapong, 2016). Ogunmwonyi *et al.* (2010) reportaram que entre os actinomicetos marinhos cultiváveis isolados da África do Sul, a maioria pertenceu ao gênero *Streptomyces*. Num estudo sobre a diversidade destes micro-organismos em solo da China, Xu *et al.* (1996) relatam que o gênero *Streptomyces* desempenha importantes funções ecológicas sendo representativo em mais de 90% dentre o total dos actinomicetos.

Tabela 5. Identificação molecular dos isolados de actinomicetos a partir do sequenciamento de DNA do gene 16S rRNA.

Isolado	Código de acesso do GenBank	Espécies	Similaridade (%)
A 517	AB184738	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	98
AR _L J 53	AB915216	<i>S. cylabdanicus</i>	99
ACSL 2	AB184839	<i>S. chartreusis</i>	99
LD 16	X79852	<i>S. galbus</i>	99
A 364	AY613990	<i>Kitasatospora viridis</i>	99
ACT 83	NR041161	<i>S. longwoodensis</i>	99
LD 13	AJ391820	<i>S. hygrosopicus</i>	100
ACT 80	AB184738	<i>S. phaeochromogenes</i>	98
ACT 115	NR112375	<i>S. thioluteus</i>	99
A 363	X79852	<i>S. galbus</i>	99
AE _p FSR II 31	DQ026666	<i>S. phaeopurpureus</i>	99
AE _p FSR II 38	AB184383	<i>S. rishiriensis</i>	99
LD 27	NR041098	<i>S. corchorusii</i>	99
A 470	AB184233	<i>S. pseudovenezuelae</i>	100
ACJ 1	NR041156	<i>S. ossamyceticus</i>	100
A 450	HQ651730	<i>Amycolatopsis bullii</i>	98
ACJ 17	NR043164	<i>S. bangladeshensis</i>	99
AR _L J 49	KF779477	<i>A. rhabdoformis</i>	100
ACSL 1	KC560729	<i>S. seymenliensis</i>	99
A 404	AB184839	<i>S. chartreusis</i>	100
LD 18	AB184738	<i>S. phaeochromogenes</i>	98
A 448	KP718602	<i>S. sioyaensis</i>	99
A 346	GU367154	<i>S. endophyticus</i>	99
AM _s J 45	EF626595	<i>S. curacoi</i>	99
AE ₃ J 76	NR025149	<i>S. yunnanensis</i>	99
KACP 35	FR692106	<i>S. laculatispora</i>	99
A 16	AJ781364	<i>S. purpeofuscus</i>	99
A 453	X79852	<i>S. galbus</i>	99
ACT 641	AB562508	<i>S. lannensis</i>	100
LD 1	AB184152	<i>S. massasporeus</i>	99
A 432	AB184357	<i>S. novaecaesareae</i>	99
AE _p FSR II 5	AY094370	<i>S. olivochromogenes</i>	99
A 12	DQ026645	<i>K. atroaurantiaca</i>	99
A 485	AB184554	<i>S. psammoticus</i>	100
AE ₃ J 66	X79852	<i>S. galbus</i>	99
ACT 93	AB248535	<i>A. echigonensis</i>	99
ACJ 29	X79852	<i>S. galbus</i>	99
AR _L J 51	AB184209	<i>S. griseoruber</i>	100
AE _p FSR II 29	D63862	<i>S. scabiei</i>	99
AM _s J 43	AB184554	<i>S. psammoticus</i>	99
AR _L J 48	AB562507	<i>S. chiangmaiensis</i>	100
LD 23	AB184553	<i>S. indiaensis</i>	100

Tabela 5. Continuação.

Isolado	Código de acesso do GenBank	Espécies	Similaridade (%)
AR _L J 52	JQ307192	<i>S. yaanensis</i>	100
ACSL 8	NR041412	<i>S. sporocinereus</i>	100
AM _S J 36	AB184554	<i>S. psammoticus</i>	100
LD 6	AJ391820	<i>S. hygrosopicus</i>	100
A 490	AY183357	<i>A. kentuckyensis</i>	100
ACJ 26	AB045877	<i>S. capoamus</i>	99
A 495	AY183358	<i>A. lexingtonensis</i>	99
A 509	HE577172	<i>S. deserti</i>	99
A 457	AY183356	<i>A. pretoriensis</i>	99
A 449	NR025149	<i>S. yunnanensis</i>	99
ACT 85	KP718602	<i>S. phaeochromogenes</i>	99
AE _p FSR II 66	EU841659	<i>S. sioyaensis</i>	99
ACT F1-1	NR025149	<i>S. variabilis</i>	100
LD 22	AB184209	<i>S. yunnanensis</i>	99
AC 64	AY083603	<i>S. griseoruber</i>	99
AC 25	U93328	<i>A. rifamycinica</i>	99
AC 82	U93328	<i>K. paracochleata</i>	99
AC 53	HQ267987	<i>K. paracochleata</i>	99
AC 54	X79852	<i>S. sasae</i>	99
AC 7	NR025149	<i>S. galbus</i>	99
AC 91	DQ026666	<i>S. yunnanensis</i>	99
AC 67	Y15507	<i>S. phaeopurpureus</i>	100
AC 27	NR041161	<i>S. lydicus</i>	99
AC 18	U93330	<i>S. longwoodensis</i>	99
AC 77	NR112362	<i>K. phosalacinea</i>	99
AC 50	AB500703	<i>S. sampsonii</i>	99
ACT 64	KP718602	<i>S. coacervatus</i>	99

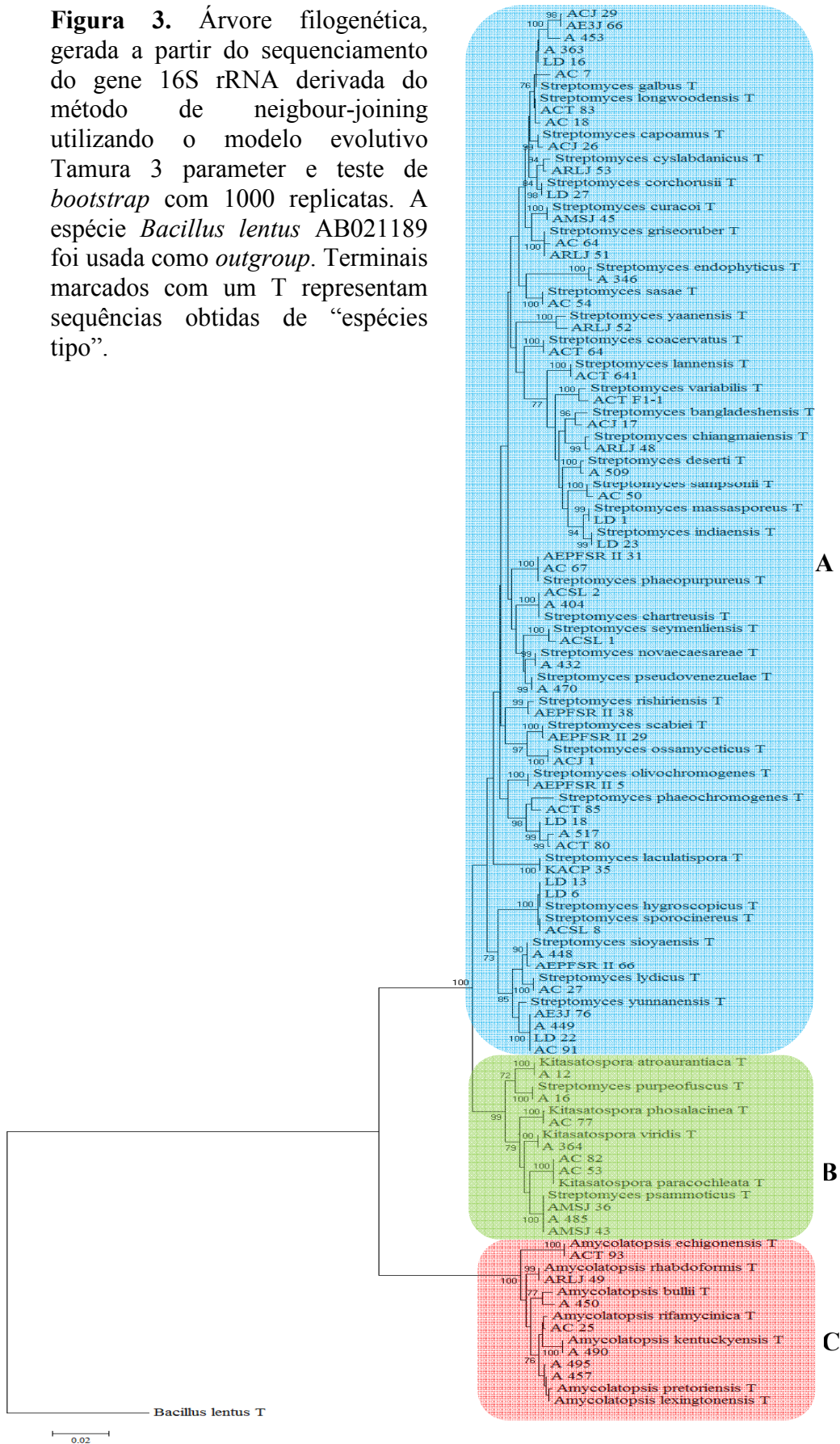
Os actinomicetos atuam na decomposição de materiais orgânicos no solo, incluindo lignina e outros polímeros recalcitrantes e degradam resíduos agrícolas e urbanos (Heuer et al., 1997). Em *Streptomyces* e outros gêneros de actinomicetos, a degradação da lignina em sistemas de compostagem acontece durante o crescimento primário e subentende-se ser o resultado do metabolismo primário (Ramachandra et al., 1998). Apesar do gênero *Streptomyces* ser aquele mais comumente encontrado nos solos (Basilio et al., 2003), novos mecanismos para o isolamento de actinomicetos com o uso de meios seletivos demonstraram que outros gêneros também são importantes, capazes de produzir metabólitos secundários de interesse (O'Donnell, 1988; Sêmedo et al., 2001).

Caracterizando actinomicetos isolados de solo tropical brasileiro, Sêmedo et al. (2001) conseguiram diferenciar isolados do gênero *Streptomyces* daqueles pertencentes ao gênero *Amycolatopsis* por meio de técnicas cromatográficas para detecção do ácido diaminopimélico (DAP). Ômura et al. (1982) propuseram o gênero *Kitasatospora* para estirpes de actinomicetos que eram morfológicamente e culturalmente semelhantes ao gênero *Streptomyces*, mas que possuíam parede celular constituída por LL-DAP, Meso-DAP glicina e galactose. No trabalho realizado sobre a diversidade filogenética de actinomicetos acidófilos da Malásia, Muramatsu et al. (2011) identificaram um isolado do gênero *Kitasatospora* obtido de matéria orgânica existente sobre o solo ácido. Chung et al. (1999) isolaram, a partir de uma amostra de solo da Coréia, um actinomiceto identificado como *K. cheerisanensis*, capaz de produzir um agente antifúngico inibitório do crescimento micelial de vários importantes fitopatógenos, tais como: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lagenarium*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

A análise fenotípica de micro-organismo fundamenta-se na caracterização morfológica e/ou bioquímica com identificação até o nível de gênero, podendo ocorrer, em poucos casos, até o nível de espécie. Contudo, as técnicas moleculares contribuem na diferenciação dos grupos de micro-organismos, fornecendo informações diretas do DNA do indivíduo. Desse modo, a biologia molecular tem sido utilizada para diferenciar e caracterizar filogeneticamente os micro-organismos de interesse (Stringari, 2004).

Dessa forma, foi realizada a análise filogenética dos isolados a partir das sequências do gene 16S rRNA, com um total de 49 táxons, construída por meio do método de neighbour-joining utilizando o modelo evolutivo Tamura 3 parameter e teste de *bootstrap* com 1.000 replicatas. Foram observados três clados distintos e bem suportados com “isolados tipo” das espécies de actinomicetos dos gêneros *Streptomyces* (A), *Kitasatospora* (B) e *Amycolatopsis* (C), confirmando a identificação obtida pelo BLAST N (Figura 3). Em geral, as sequências dos isolados que foram relacionadas às “espécies tipo” ficaram agrupadas, confirmando sua identidade e separação taxonômica em relação aos outros grupos. Diante dos resultados, percebe-se que a separação entre as espécies está bem delimitada e com predominância do gênero *Streptomyces* sob os demais. A maioria dos ramos ficou bem suportada com um valor de *bootstrap* acima de 70%.

Figura 3. Árvore filogenética, gerada a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA derivada do método de neighbour-joining utilizando o modelo evolutivo Tamura 3 parameter e teste de *bootstrap* com 1000 replicatas. A espécie *Bacillus lentus* AB021189 foi usada como *outgroup*. Terminais marcados com um T representam seqüências obtidas de “espécies tipo”.



As sequências dos isolados de actinomicetos A495 e A457, identificados no BLAST N como *A. lexingtonensis* e *A. pretoriensis*, respectivamente, não se alinharam com as respectivas “espécies tipo”, porém foram agrupados no clado de *Amycolatopsis*, suportados por um bootstrap de 100% (Figura 3). As divergências entre os alinhamentos destas sequências e das sequências do gênero *Amycolatopsis* depositadas no GenBank evidenciam, aparentemente, se tratar de espécies ainda não descritas.

Dois isolados identificados como *S. purpeofuscus* e *S. psammoticus* foram alinhados com as “espécies tipo” do GenBank, porém agruparam no clado do gênero *Kitasatospora*. De acordo com Wellington et al. (1992) e Ochi & Hiranuma (1994), os gêneros *Streptomyces* e *Kitasatospora* são intimamente relacionados filogeneticamente e se diferem pela presença de LL isômeros de ácido diaminopimérico presentes tanto no esporo aéreo e submerso e micélio vegetativo nos membros do gênero *Streptomyces* enquanto que no gênero *Kitasatospora* o LL isômeros de ácido diaminopimérico encontram-se apenas no esporo aéreo e submerso e meso isômeros de ácido diaminopimérico (meso-DAP) constituem o micélio vegetativo (Ômura et al., 1982; Takahashi et al., 1984; Zhang et al., 1997, Takahashi, 2017). Zhang et al. (1997) também relataram que a formação de esporos em meio de cultura líquido e a resistência a fagos polivalentes de *Streptomyces* são características que permitem a distinção entre estes dois gêneros.

4.3. Caracterização enzimática de actinomicetos

4.3.1. Detecção da atividade amilolítica

A eficiência da atividade amilolítica foi determinada pela formação de halo amarelo ao redor da colônia, indicando a produção de amilase (Figura 4). De acordo com Lajolo & Menezes (2006), o amido encontra-se amplamente distribuído em várias espécies vegetais, sendo os seus principais constituintes a amilose e amilopectina. A amilase (EC 3.2.1.1), enzima que catalisa a hidrólise da molécula de amido, encontra-se entre as classes mais relevantes das enzimas sendo de grande importância para os processos biotecnológicos atuais, por causa da sua ampla aplicação industrial (Pandey et al., 2000).

Do total de 69 isolados, 16 (23,2%) não foram capazes de formar halo, indicando que os micro-organismos não foram capazes de produzir amilase nas condições avaliadas. O

índice enzimático (IE) variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre os actinomicetos capazes de degradar o amido em meio de cultura (Tabela 6). Entre eles, sete isolados (10,1%) apresentaram $IE < 2$, indicando baixa atividade amilolítica, enquanto 46 (66,7%) apresentaram $IE \geq 2,0$, classificados como potenciais produtores de amilase de acordo com Lealem & Gashe (1994).

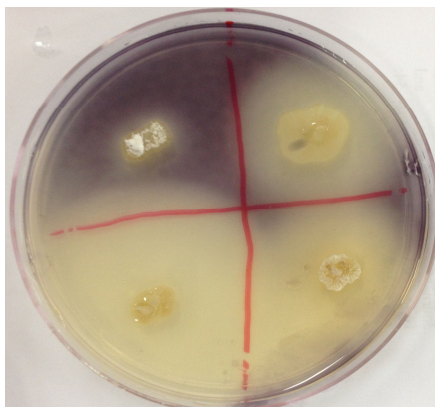


Figura 4. Halo indicativo da produção da enzima amilase por isolados de actinomicetos em meio de cultura ágar amido, incubados por 10 dias a 28 °C.

Os isolados AM_SJ 45 e LD 6, pertencentes ao gênero *Streptomyces*, apresentaram, em média, os maiores índices enzimáticos demonstrando elevado potencial amilolítico (IE= 6,44) (Tabela 6). Valores semelhantes foram relatados por Van Der Sand et al. (2014), que avaliaram actinomicetos endofíticos isolados de plantas de tomate. Karanja et al. (2010) verificaram IE entre 3,4 e 5,2 para degradação do amido para espécies de *Streptomyces* sp. obtidos de solos no Quênia. Em geral, os isolados testados que apresentaram os maiores valores de IE para a degradação do amido pertenceram ao gênero *Streptomyces*, que tem sido relatado com alta eficiência na produção de amilase (Vigal et al., 1991). Embora possa ser oriunda de fontes animais e vegetais, as amilases de origem microbiana são as mais requeridas pelas indústrias (Albuquerque et al., 2010) por causa da produção em massa e facilidade de manipulação do micro-organismo (Tanyildizi et al., 2005).

Foi observado que os micro-organismos pertencentes ao gênero *Amycolatopsis* não possuíram a capacidade de hidrolisar o amido (Tabela 6), em consonância com diversos estudos envolvendo as espécies *A. pretoriensis*, *A. lexingtonensis* (Labeda et al., 2003), *A. mediterranei*, *A. rifamycinica* (Bala et al., 2004), *A. echigonensis* e *A. niigatensis* (Ding et al., 2007).

4.3.2. Detecção da atividade celulolítica

A capacidade celulolítica dos isolados de actinomicetos foi determinada pela formação de uma zona mais clara ao redor da colônia que é um indicador da degradação da celulose em meio de cultura (Figura 5). A celulose é o maior constituinte da biomassa vegetal, sendo o biopolímero mais abundante no mundo e, portanto, uma fonte sustentável para processos industriais (Mansfield & Meder, 2003) e para produção de glicose decorrente de sua bioconversão através da atuação das celulasas (Klyosov, 1990). Celulasas (EC 3.2.1.4) são enzimas que convertem a celulose em açúcares simples de fácil acesso para o consumo humano (Mohanta, 2014). Esta enzima realiza a quebra das ligações entre as moléculas de glicose que constituem a celulose e envolve a ação sinérgica de algumas enzimas como endoglucalase, exoglucanase e β -glucosidase (Wachinger et al., 1989).

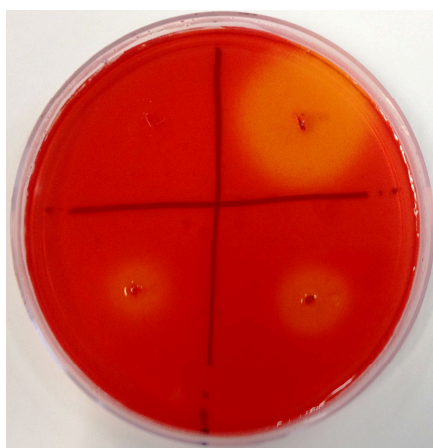


Figura 5. Halo indicativo da produção da enzima celulase por isolados de actinomicetos em meio de cultura, suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono, incubados por 10 dias a 28 °C.

Do total de isolados, 14 (20,3%) não formaram halo em meio de cultura com carboximetilcelulose, indicando que os micro-organismos não foram capazes de produzir enzimas capazes de degradar a celulose nas condições avaliadas (Tabela 6). A degradação da celulose através do uso de enzimas de origem microbiana se destaca por causa do seu alto valor industrial na aplicação de diversos processos biotecnológicos (BHAT & BHAT, 1997). Micro-organismos que excretam celulasas desempenham um importante papel na natureza por estabelecerem um elo chave na ciclagem do carbono (Ruegger & Tauk-Tornisielo, 2004) e formação de húmus (Padilha, 1998).

O IE variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre os actinomicetos capazes de degradar a celulose em meio de cultura. Entre eles, dois isolados (2,9%) apresentaram $IE < 2$, indicando baixa atividade, enquanto 53 (76,8%) apresentaram $IE \geq 2,0$, classificados como potenciais produtores de celulases (Lealem & Gashe, 1994). Avaliando o potencial enzimático de actinomicetos provenientes de compostagem, Rodrigues (2006) verificou a degradação da celulose em 91% dos isolados avaliados, sendo este resultado superior ao observado no presente estudo. O maior percentual registrado por este autor pode ser explicado pelo fato da quantidade de celulose em processos de compostagem ser superior àquela disponível no solo, favorecendo a seleção de espécies relacionadas à sua degradação.

Os isolados AR_LJ 48 e AR_LJ 53, pertencentes ao gênero *Streptomyces*, apresentaram, em média, os maiores índices enzimáticos demonstrando elevado potencial celulolítico, com valores de IE até 6,56. Van Der Sand et al. (2014), em estudo de caracterização enzimática de actinomicetos endofíticos isolados de plantas de tomate, observaram que o maior IE registrado para degradação de celulose foi de 4,04. Silva et al., (2015) constataram um IE de 6,90 produzido por actinomicetos isolados de solo rizosférico do semiárido brasileiro, identificados como *Streptomyces* sp., sendo este valor semelhante ao observado no presente estudo. Os actinomicetos, principalmente do gênero *Streptomyces*, atuam na degradação de moléculas complexas e recalcitrantes, especialmente a celulose, xilana e lignina, abundantes na biomassa vegetal (Crawford, 1988; Ramírez & Cocha, 2003). A capacidade em degradar a celulose confere a este gênero um papel de destaque nos processos de compostagem onde o produto final pode ser utilizado na produção de cogumelos comestíveis, como fertilizante agrícola, cultivo de vegetação em acostamentos de estradas, como biofiltros e na biorremediação (Silva, 2010). Nesse contexto, os micro-organismos caracterizados neste estudo quanto à capacidade em degradar a celulose são potencialmente promissores para aplicações biotecnológicas.

4.3.3. Detecção da atividade lipolítica

A capacidade lipolítica dos micro-organismos avaliados foi determinada pela formação de um halo de cor azul ao redor da colônia, indicador da degradação de lipídio, quando o meio de cultura enriquecido com óleo de oliva foi submetido à irradiação ultravioleta em razão da fluorescência da rodamina B (Figura 6). Os lipídeos são

biomoléculas de ésteres de glicerol e ácidos graxos que se encontram armazenados sob a forma de triacilgliceróis em tecidos de plantas e animais (Alef & Nannipieri 1995). A utilização dessas biomoléculas, assim como óleos vegetais, por micro-organismos cultivados em meio suplementado com estes compostos, ocorre por causa da produção de lipases e favorece a síntese de substâncias bioativas oriundas do metabolismo secundário (Pan et al., 1959; Choi et al., 1996). As lipases (E.C. 3.1.1.3), são enzimas que catalisam a primeira reação de quebra do lipídeo exógeno (Large et al., 1999), é reconhecida como um biocatalisador em biotecnologia em razão da sua ampla versatilidade podendo ser aplicada em diferentes processos industriais, como no processamento de alimentos, fabricação de detergentes, síntese de produtos químicos e fármacos, processamento de óleos e gorduras e produção de cosméticos, além de serem utilizadas no tratamento de efluentes gordurosos (Bornscheuer, 2002).

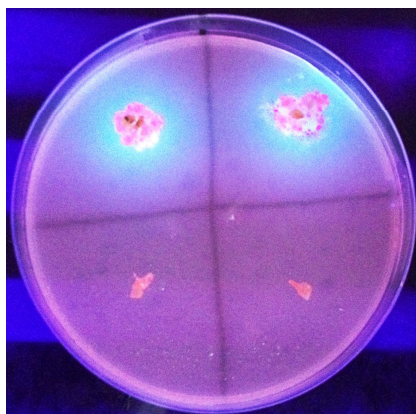


Figura 6. Halo de coloração azul indicativo da produção da enzima lipase por isolados de actinomicetos em meio de cultura, suplementado com óleo de oliva, incubados por 72 horas a 28 °C.

O IE para produção de lipase variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre os actinomicetos avaliados, sendo 15 (21,8%) considerados bons produtores desta enzima, com valores superiores a 2 (Lealem & Gashe, 1994). Observa-se que 41 (59,4%) isolados não foram capazes de hidrolisar o lipídeo e 13 (18,8%) não produziram enzima suficiente para serem caracterizados bons produtores (Tabela 6). As lipases são amplamente encontradas na natureza, porém as de origem microbiana apresentam peculiaridade ao substrato, uma propriedade que parece ter evoluído para garantir o acesso de micro-organismos produtores desta enzima a inúmeras fontes de carbono durante a deterioração da parede celular dos

vegetais ou no processo de reciclagem de compostos constituídos por lipídios (Bornscheuer, 2002, Roveda et al., 2010). As lipases sintetizadas por micro-organismo possuem características enzimáticas diversificadas que são muito atrativas para a aplicação industrial (Hasan et al., 2006).

Foi observado que o isolado LD 6, pertencente ao gênero *Streptomyces*, apresentou, em média, o maior IE demonstrando seu elevado potencial lipolítico em relação aos demais micro-organismos avaliados (Tabela 6). Os lipídios são comumente utilizados como fontes de carbono na fermentação de actinomicetos do gênero *Streptomyces*, entretanto, o conhecimento sobre a atividade lipolítica deste grupo ainda é pouco conhecida (Tesch et al., 1996; Sommer et al., 1997; Abramic et al., 1999; Karanja et al., 2010).

Karanja et al. (2010) observaram um índice enzimático variando entre 3,0 e 4,2 para atividade lipolítica de novas espécies de *Streptomyces* isoladas de solos no Quênia. Contudo, observa-se que o menor IE mensurado por estes autores é superior ao encontrado no presente estudo que foi de 2,60. Mohamed et al. (2015), avaliando a atividade enzimática de estreptomicetos obtidos de amostras de solo da Arábia Saudita detectaram a atividade lipolítica em mais de 90% dos isolados, sendo esse valor muito superior ao encontrado no presente estudo. Segundo Van Der Sand et al. (2014), o baixo índice de isolados aceitos como bons produtores de lipase pode estar ligado às temperaturas de incubação e/ou especificidade do substrato utilizado. Nithangeni et al. (2001), afirmam que as lipases são bastante específicas e, assim, suas atividades hidrolíticas podem variar de acordo com a composição triacilglicerol do óleo utilizado no meio de cultivo.

Tabela 6. Índice enzimático (IE) de amilase, celulase e lipase de isolados de actinomicetos da Coleção de Micro-organismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF- MS).

Isolado	Espécie	Índice enzimático		
		Amilase	Celulase	Lipase
AM _S J 45	<i>Streptomyces curacoii</i>	6,44 a	4,17 d	1,13 e
LD 6	<i>S. hygroscopicus</i>	6,42 a	4,00 e	2,60 a
AC 82	<i>Kitasatospora paracochleata</i>	6,00 b	3,75 e	0,00
KACP 35	<i>S. laculatispora</i>	5,70 c	3,67 e	0,00
AE _p FSR II 29	<i>S. scabiei</i>	5,52 c	5,08 c	2,10 b
ACSL 8	<i>S. sporocinereus</i>	5,43 c	3,67 e	1,22 e
ACJ 1	<i>S. ossamyceticus</i>	5,14 d	4,42 d	0,00
AC 7	<i>S. galbus</i>	5,10 d	3,78 e	0,00
LD 27	<i>S. corchorusii</i>	5,00 d	5,50 b	0,00
A 432	<i>S. novaecaesareae</i>	4,93 d	3,17 f	0,00
LD 13	<i>S. hygroscopicus</i>	4,87 d	5,33 b	0,00
A 12	<i>K. atroaurantiaca</i>	4,81 d	2,93 f	1,46 d
A 485	<i>S. psammoticus</i>	4,52 e	4,53 d	1,51 d
AM _S J 43	<i>S. psammoticus</i>	4,51 e	1,83 g	0,00
AC 27	<i>S. lydicus</i>	4,31 f	0,00	1,66 c
ACJ 17	<i>S. bangladeshensis</i>	4,28 f	5,08 c	0,00
AE _p FSR II 66	<i>S. Sioyaensis</i>	4,18 f	0,00	0,00
LD 16	<i>S. galbus</i>	4,13 f	4,58 d	0,00
A 470	<i>S. pseudovenezuelae</i>	4,00 f	4,33 d	0,00
ACT 64	<i>S. coacervatus</i>	3,60 g	2,86 f	2,12 b
AR _L J 51	<i>S. griseoruber</i>	3,45 g	4,55 d	2,23 b
AC 54	<i>S. sasae</i>	3,42 g	0,00	2,23 b
AC 18	<i>S. longwoodensis</i>	3,40 g	3,83 e	0,00
AE _p FSR II 31	<i>S. phaeopurpureus</i>	3,39 g	4,07 d	2,00 b
ACJ 26	<i>S. capoamus</i>	3,29 g	3,83 e	1,75 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Continuação

Isolado	Espécie	Índice enzimático		
		Amilase	Celulase	Lipase
AE _p FSR II 5	<i>S. olivochromogenes</i>	3,29 g	3,58 e	2,07 b
A 449	<i>S. yunnanensis</i>	3,27 g	1,78 g	0,00
LD 23	<i>S. indiaensis</i>	3,22 g	5,13 c	0,00
AC 67	<i>S. phaeopurpureus</i>	3,21 g	3,92 e	2,16 b
LD 22	<i>S. yunnanensis</i>	3,15 g	0,00	0,00
AC 50	<i>S. sampsonii</i>	3,13 g	3,93 e	0,00
A 346	<i>S. endophyticus</i>	3,07 g	3,56 e	0,00
LD 18	<i>S. phaeochromogenes</i>	2,93 h	4,33 d	0,00
AE _p FSR II 38	<i>S. rishiriensis</i>	2,83 h	4,47 d	0,00
ACT 83	<i>S. longwoodensis</i>	2,77 h	4,92 c	0,00
AC 91	<i>S. yunnanensis</i>	2,71 h	0,00	0,00
LD 1	<i>S. massasporeus</i>	2,67 h	3,42 e	0,00
A 363	<i>S. galbus</i>	2,62 h	5,06 c	2,27 b
A 448	<i>S. siوياensis</i>	2,61 h	0,00	0,00
A 517	<i>S. phaeochromogenes</i>	2,55 h	5,70 b	2,07 b
ACT 115	<i>S. thioluteus</i>	2,37 i	0,00	0,00
A 509	<i>S. deserti</i>	2,29 i	4,27 d	0,00
ACSL 1	<i>S. seymenliensis</i>	2,20 i	3,36 e	2,17 b
ACJ 29	<i>S. galbus</i>	2,17 i	4,75 c	0,00
AC 77	<i>K. phosalacinea</i>	2,14 i	4,21 d	1,79 c
AE ₃ J 66	<i>S. galbus</i>	2,03 j	3,55 e	0,00
A 404	<i>S. chartreusis</i>	1,98 j	3,90 e	1,52 d
A 453	<i>S. galbus</i>	1,96 j	0,00	0,00
ACT 641	<i>S. lannensis</i>	1,90 j	2,75 f	1,37 e
AC 53	<i>K. paracochleata</i>	1,65 k	3,44 e	0,00

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Continuação

Isolado	Espécie	Índice enzimático		
		Amilase	Celulase	Lipase
ACSL 2	<i>S. chartreusis</i>	1,52 k	5,55 b	0,00
ACT 80	<i>S. phaeochromogenes</i>	1,24 l	0,00	0,00
AC 64	<i>S. griseoruber</i>	1,13 m	2,73 f	2,20 b
AR _L J 53	<i>S. cyslabdanicus</i>	0,00	6,56 a	2,08 b
A 364	<i>K. viridis</i>	0,00	0,00	1,93 b
A 450	<i>Amycolatopsis bullii</i>	0,00	3,98 e	1,68 c
AR _L J 49	<i>A. rhabdoformis</i>	0,00	0,00	1,58 d
AE ₃ J 76	<i>S. yunnanensis</i>	0,00	0,00	0,00
A 16	<i>S. purpeofuscus</i>	0,00	4,17 d	0,00
ACT 93	<i>A. echigonensis</i>	0,00	0,00	0,00
AR _L J 48	<i>S. Chiangmaiensis</i>	0,00	6,56 a	0,00
AR _L J 52	<i>S. yaanensis</i>	0,00	4,58 d	2,13 b
AM _S J 36	<i>S. psammoticus</i>	0,00	5,00 c	0,00
A 490	<i>A. kentuckyensis</i>	0,00	2,89 f	0,00
A 495	<i>A. lexingtonensis</i>	0,00	3,20 f	0,00
A 457	<i>A. pretoriensis</i>	0,00	4,42 d	1,47 d
ACT 85	<i>S. phaeochromogenes</i>	0,00	4,28 d	0,00
ACT F1-1	<i>S. variabilis</i>	0,00	0,00	0,00
AC 25	<i>A. rifamycinica</i>	0,00	4,39 d	2,02 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.4. Antibiograma

Nesse trabalho, foi realizado o antibiograma para verificar a susceptibilidade do fitopatógeno *P. ananatis* a antibióticos comerciais (Figura 7). O antibiograma fundamenta-se na capacidade de difusão do antimicrobiano, impregnado em um disco de papel filtro, através de um meio sólido (Bauer et al., 1966). Esta técnica é muito utilizada em razão da sua praticidade, baixo custo e rapidez na obtenção dos resultados de sensibilidade ou resistência do micro-organismo alvo ao antibiótico (Esmerino, et al., 2003).

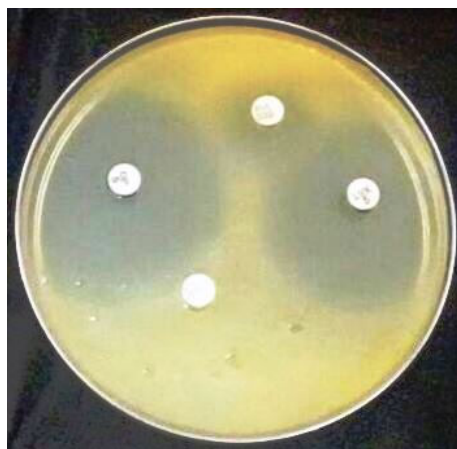


Figura 7. Halo de inibição indicativo da susceptibilidade de *Pantoea ananatis* a antimicrobianos comerciais, inoculada em meio de cultura BDA, incubado por 48 horas a 30 °C.

A Tabela 7 mostra o diâmetro médio dos halos de inibição obtidos no antibiograma utilizando 25 antibióticos comerciais contra duas estirpes fitopatogênicas de *P. ananatis*. Houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no teste de atividade antimicrobiana entre os antibióticos e entre as duas estirpes, sendo que os isolados da bactéria *P. ananatis* apresentaram sensibilidade a, aproximadamente, 50% dos antimicrobianos testados. Os antibióticos norfloxacin e ciprofloxacina apresentaram, em média, a maior atividade antibacteriana contra ambas as estirpes de *P. ananatis*, demonstrando seu elevado potencial para o uso no controle químico deste fitopatógeno. A estirpe CMPC 40 de *P. ananatis* apresentou, em média, maior sensibilidade aos antimicrobianos, evidenciando a variabilidade genética do fitopatógeno.

De acordo com a classificação do grau de atividade antimicrobiana adotada por Matsuura (2004), nota-se que no teste de antibiograma os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, levofloxacina, tetraciclina, neomicina, cloranfenicol, cefoxitina, sulfazotrim, amicacina e kanamicina demonstraram alta atividade antimicrobiana, enquanto tobramicina e gentamicina apresentaram atividade moderada (Tabela 7). Em estudo de monitoramento e caracterização da população epifítica de *P. ananatis* em plantas de milho oriundas de Sete Lagoas-Minas Gerais e Londrina-Paraná, Sauer (2010) observou que estirpes da bactéria *P. ananatis* submetidas a teste de inibição em presença de diferentes antibióticos apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos amicacina, neomicina, clorafenicol, gentamicina, norflaxacina, sulfazotim e tetraciclina e eritromicina.

Os antibióticos podem ser classificados em diferentes categorias de acordo com o seu principal mecanismo de ação (Neu, 1992). Assim, observou-se que o fitopatógeno do presente estudo foi susceptível a antimicrobianos capazes de inibir a síntese da parede celular (cefotaxima), a síntese proteica (tetraciclina, cloranfenicol, tobramicina, gentamicina, neomicina, amicacina e kanamicina), a síntese do DNA (ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacin e levofloxacina) e de inibir as reações metabólicas (sulfazotrim - Sulfametoxazol + Trimetoprim).

O uso do antibiótico oxitetraciclina permitiu uma redução de aproximadamente 80-90% no número de lesões da mancha-branca em plantas de milho cultivadas no campo, bem como inibiu em 100% o crescimento de *P. ananatis in vitro* (Pedro et al., 2012; Gonçalves et al., 2013). Resultados semelhantes foram encontrados previamente por Silva et al. (2009) utilizando oxitetraciclina como controle químico da doença mancha-branca do milho.

Os antibióticos oxitetraciclina e oxitetraciclina + streptomycin foram previamente utilizados no controle da mancha-branca do milho e apresentaram eficiência de 60% no manejo da doença em relação à testemunha quando aplicado nos estádios fenológicos V8 (oito folhas totalmente desenvolvidas) e pré-florescimento (Manerba et al. (2013). Em outro estudo, Costa et al. (2011) avaliando a eficiência de diferentes agentes químicos para o controle da mancha-branca também observaram que o antibiótico oxitetraciclina foi capaz de controlar a doença. A oxitetraciclina pertence a família das tetraciclins, um dos fármacos mais importantes por conta do seu largo espectro de ação antibacteriano (Couto et al., 2000) que é produzido por diversas espécies de *Streptomyces* (Oka et al., 1994; Ruela et al., 2005).

Segundo Manerba et al. (2013) o emprego dos antibióticos oxitetraciclina e streptomicina aumentou a produtividade do milho em relação a testemunha, permitindo maior área foliar sadia para realização da fotossíntese e influenciando positivamente na produção de grãos.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana contra as estirpes bacterianas de *P. ananatis* utilizando antimicrobianos comerciais.

Antimicrobianos	Concentração	Diâmetro do halo de inibição		Grau de atividade antimicrobiana
		Estirpe CMPC 40	Estirpe CMPC 105	
	 mm		
Norfloxacina	10 mcg	37,67 a	39,67 a	Alta
Ciprofloxacina	5 mcg	37,67 a	39,00 a	Alta
Ácido nalidíxico	30 mcg	34,67 b	31,00 b	Alta
Levofloxacina	5 mcg	34,67 b	28,33 c	Alta
Tetraciclina	30 mcg	35,00 b	27,00 c	Alta
Cloranfenicol	30 mcg	30,33 c	25,33 d	Alta
Cefoxitina	30 mcg	27,33 d	23,33 d	Alta
Sulfazotrim	25 mcg	22,33 e	20,67 e	Alta
Amicacina	30 mcg	17,33 f	20,00 e	Alta
Kanamicina	30 mcg	16,33 f	17,00 f	Alta
Neomicina	200 mcg	16,00 f	16,33 f	Alta
Tobramicina	10 mcg	15,33 f	13,67 g	Alta/Moderada
Gentamicina	10 mcg	13,33 g	12,67 g	Moderada
Clindamicina	2 mcg	0,00	0,00	Ausente
Sulfonamidas	300 mcg	0,00	0,00	Ausente
Ampicilina	10 mcg	0,00	0,00	Ausente
Cefazolina	30 mcg	0,00	0,00	Ausente
Vancomicina	30 mcg	0,00	0,00	Ausente
Oxacilina	1 mcg	0,00	0,00	Ausente
Cefotaxima	30 mcg	0,00	0,00	Ausente
Eritromicina	15 mcg	0,00	0,00	Ausente
Penicilina G	10 U.I.	0,00	0,00	Ausente
Nitrofurantoina	300 mcg	0,00	0,00	Ausente
Ceftriaxona	30 mcg	0,00	0,00	Ausente
Cefalotina	30 mcg	0,00	0,00	Ausente

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados de actinomicetos

4.5.1 Seleção primária dos isolados de actinomicetos em meio sólido

Uma triagem primária da atividade antimicrobiana foi realizada com os actinomicetos, utilizando o método de sobrecamada com o objetivo de verificar diretamente o espectro de ação antagônica *in vitro* desses micro-organismos submetidos ou não a radiação UV frente à *P. ananatis* (Figura 8).

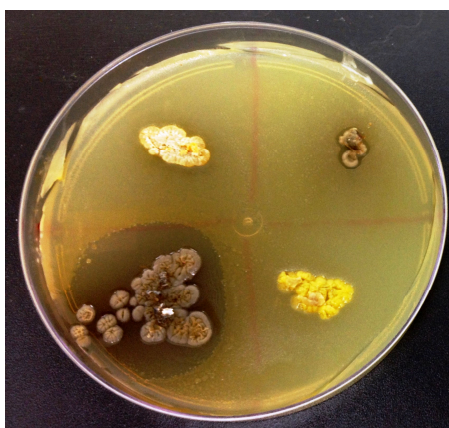


Figura 8. Halo de inibição indicativo da atividade antagônica dos actinomicetos frente a estirpe fitopatogênica de *Pantoea ananatis* utilizando a técnica de sobrecamada.

Nove isolados (13%) não expostos à irradiação UV apresentaram atividade antimicrobiana entre baixa e alta (Tabela 8) de acordo com a escala utilizada no trabalho de Matsuura (2004). Três isolados (4,4%), todos do gênero *Streptomyces*, apresentaram atividade antimicrobiana com classificação entre moderada e alta conforme escala adotada por Matsuura (2004) quando expostos ou não a irradiação UV. A exposição à luz pode acarretar na degradação e instabilidade das substâncias antimicrobianas difundidas no meio de cultura conforme observado no presente estudo e relatado por Trissel (2001) e Monteiro et al. (2012).

As morfoespécies A 470 e A 432 destacam-se em relação ao isolado KACP 35 (Tabela 8), pois apresentaram elevada atividade antimicrobiana quando expostos ou não a radiação ultravioleta. A baixa frequência de actinomicetos com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, como *P. ananatis*, pode estar relacionada à complexa estrutura da membrana externa destes micro-organismos (Rodrigues, 2006; Nithya et al., 2012).

Tabela 8. Eficiência da atividade antibacteriana e classificação do grau de atividade de isolados de actinomicetos contra duas estirpes fitopatogênicas da bactéria *Pantoea ananatis*.

Isolado	Espécie	Diâmetro dos halos de inibição		Grau de atividade
		Sem exposição à luz UV	Com exposição à luz UV	
		mm		
A 470	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	36,00 a	24,00 a	Alta
A 432	<i>S. novaecaesareae</i>	19,00 b	14,00 b	Alta
KACP 35	<i>S. laculatispora</i>	13,00 c	12,00 c	Moderada
ACSL 8	<i>S. sporocinereus</i>	10,00 d	0,00	Baixa/Ausente
LD 23	<i>S. indiaensis</i>	10,00 d	0,00	Baixa/Ausente
A 450	<i>Amycolatopsis bullii</i>	9,00 e	0,00	Baixa/Ausente
LD 1	<i>S. massasporeus</i>	9,00 e	0,00	Baixa/Ausente
AR _L J 52	<i>S. yaanensis</i>	9,00 e	0,00	Baixa/Ausente
LD 18	<i>S. phaeochromogenes</i>	8,00 e	0,00	Baixa/Ausente
A 517	<i>S. phaeochromogenes</i>	0,00	0,00	Ausente
AR _L J 53	<i>S. cylabdanicus</i>	0,00	0,00	Ausente
ACSL 2	<i>S. chartreusis</i>	0,00	0,00	Ausente
LD 16	<i>S. galbus</i>	0,00	0,00	Ausente
A 364	<i>Kitasatospora viridis</i>	0,00	0,00	Ausente
ACT 83	<i>S. longwoodensis</i>	0,00	0,00	Ausente
LD 13	<i>S. hygrosopicus</i>	0,00	0,00	Ausente
ACT 80	<i>S. phaeochromogenes</i>	0,00	0,00	Ausente
ACT 115	<i>S. thioluteus</i>	0,00	0,00	Ausente
A 363	<i>S. galbus</i>	0,00	0,00	Ausente
AE _p FSR II 31	<i>S. phaeopurpureus</i>	0,00	0,00	Ausente
AE _p FSR II 38	<i>S. rishiriensis</i>	0,00	0,00	Ausente
ACJ 17	<i>S. bangladeshensis</i>	0,00	0,00	Ausente
LD 27	<i>S. corchorusii</i>	0,00	0,00	Ausente

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 8. Continuação.

Isolado	Espécie	Diâmetro dos halos de inibição		Grau de atividade
		Sem exposição à luz UV	Com exposição à luz UV	
		mm		
ACJ 1	<i>S. ossamyceticus</i>	0,00	0,00	Ausente
AR _L J 49	<i>A. rhabdoformis</i>	0,00	0,00	Ausente
ACSL 1	<i>S. seymenliensis</i>	0,00	0,00	Ausente
A 404	<i>S. chartreusis</i>	0,00	0,00	Ausente
A 448	<i>S. sioyaensis</i>	0,00	0,00	Ausente
A 346	<i>S. endophyticus</i>	0,00	0,00	Ausente
AM _S J 45	<i>S. curacoi</i>	0,00	0,00	Ausente
AE ₃ J 76	<i>S. yunnanensis</i>	0,00	0,00	Ausente
A 16	<i>S. purpeofuscus</i>	0,00	0,00	Ausente
A 453	<i>S. galbus</i>	0,00	0,00	Ausente
ACT 641	<i>S. lannensis</i>	0,00	0,00	Ausente
AE _p FSR II 5	<i>S. olivochromogenes</i>	0,00	0,00	Ausente
A 12	<i>K. atroaurantiaca</i>	0,00	0,00	Ausente
A 485	<i>S. psammoticus</i>	0,00	0,00	Ausente
AE ₃ J 66	<i>S. galbus</i>	0,00	0,00	Ausente
ACT 93	<i>A. echigonensis</i>	0,00	0,00	Ausente
ACJ 29	<i>S. galbus</i>	0,00	0,00	Ausente
AR _L J 51	<i>S. griseoruber</i>	0,00	0,00	Ausente
AE _p FSR II 29	<i>S. scabiei</i>	0,00	0,00	Ausente
AM _S J 43	<i>S. psammoticus</i>	0,00	0,00	Ausente
AR _L J 48	<i>S. chiangmaiensis</i>	0,00	0,00	Ausente
AM _S J 36	<i>S. psammoticus</i>	0,00	0,00	Ausente
LD 6	<i>S. hygrosopicus</i>	0,00	0,00	Ausente

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 8. Continuação.

Isolado	Espécie	Diâmetro dos halos de inibição		Grau de atividade
		Sem exposição à luz UV	Com exposição à luz UV	
		mm		
A 490	<i>A. kentuckyensis</i>	0,00	0,00	Ausente
ACJ 26	<i>S. capoamus</i>	0,00	0,00	Ausente
A 495	<i>A. lexingtonensis</i>	0,00	0,00	Ausente
A 509	<i>S. deserti</i>	0,00	0,00	Ausente
A 457	<i>A. pretoriensis</i>	0,00	0,00	Ausente
A 449	<i>S. yunnanensis</i>	0,00	0,00	Ausente
ACT 85	<i>S. phaeochromogenes</i>	0,00	0,00	Ausente
AE _p FSR II 66	<i>S. sioyaensis</i>	0,00	0,00	Ausente
ACT F1-1	<i>S. variabilis</i>	0,00	0,00	Ausente
LD 22	<i>S. yunnanensis</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 64	<i>S. griseoruber</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 25	<i>A. rifamycinica</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 82	<i>K. paracochleata</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 53	<i>K. paracochleata</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 54	<i>S. sasae</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 7	<i>S. galbus</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 91	<i>S. yunnanensis</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 67	<i>S. phaeopurpureus</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 27	<i>S. lydicus</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 18	<i>S. longwoodensis</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 77	<i>K. phosalacinea</i>	0,00	0,00	Ausente
AC 50	<i>S. sampsonii</i>	0,00	0,00	Ausente
ACT 64	<i>S. coacervatus</i>	0,00	0,00	Ausente

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Nesse estudo, as espécies *S. pseudovenezuelae*, *S. novaecaesareae* e *S. laculatispora* foram responsáveis pela produção de antimicrobianos contra a bactéria *P. ananatis* em meio sólido. O isolamento, triagem e caracterização de estirpes de actinomicetos produtores de metabólitos secundários tornou-se uma área de interesse para pesquisa por muitos grupos em todo o mundo (Hacène et al., 2000; Laidi et al., 2006; Chaudhary et al., 2013). A busca por actinomicetos do gênero *Streptomyces* em habitats pouco estudados eleva a perspectiva de descobrimento de novos produtos naturais que podem ser desenvolvidos com auxílio da biotecnologia (Eccleston et al., 2008; Ogunmwonyi et al. 2010).

Muitos compostos bioativos produzidos por actinomicetos evidenciam a ação antibacteriana e antimicrobiana desses produtos contra vários agentes patogênicos e patógenos resistentes a múltiplos fármacos (Saadoun et al., 1999; Servin et al., 2008; Selvameenal et al., 2009; Singh et al., 2012; Chaudhary et al., 2013). De acordo com Yamaguchi & Uchida (1988), vários trabalhos de detecção de atividade antimicrobiana contra inúmeros patógenos de interesse para a agricultura eram realizados com o uso de diversos antibióticos isolados de micro-organismos do gênero *Streptomyces*. Cohen & Coffey (1986) relataram que estreptomicina e ciclohexamida, antibióticos produzidos por *S. griseus*, foram utilizadas no controle de doenças de plantas na década de 1950.

Testes *in vitro* com actinomicetos têm demonstrado o antagonismo frente a vários tipos de fitopatógenos, tais como inibição de *Botrytis cinerea* (Oliveira, 2004); *Meloidogyne javanica* (Coimbra & Campos, 2010); *Rhizoctonia solani* (Rothrock & Gottlieb, 1984; Doumbou et al., 2001); *Bipolaris sorokiniana* (Van Der Sand, 2014); *Ralstonia solanacearum* (Moura & Romeiro, 1999; Sahilah et al., 2010), revelando o quanto é promissora a utilização desses micro-organismos no controle biológico. Todavia, salienta-se que o número de pesquisas relacionadas ao antagonismo dos actinomicetos frente às doenças de plantas ainda é restrito.

Avaliando *in vitro* actinomicetos como antagonistas a bactéria *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana em tomateiro, Moura e Romeiro (1999) observaram amplo espectro de atividade antagonística contra o patógeno, sugerindo existência de diversidade da capacidade antibacteriana dentro deste grupo de micro-organismo. Actinomicetos endofíticos do gênero *Streptomyces* podem promover o crescimento das plantas melhorando a produção agrícola e reduzir o impacto causado pelos fitopatógenos causadores da podridão de raiz e coroa em trigo (Coombs et al., 2004; Van Der Sand, 2014).

Carrer Filho et al. (2009) relataram que no ensaio de biocontrole experimental em casa de vegetação o micro-organismo *S. setonii*, obtido da rizosfera de planta sadia de tomateiro, foi capaz de reduzir significativamente as lesões por folíolo perante todos os fitopatógenos testados, tanto fúngicos como bacterianos, demonstrando ser um potencial agente de controle biológico de doenças do tomateiro. Em ensaios preliminares de detecção de atividade antimicrobiana utilizando actinomicetos obtidos do solo da Etiópia, Bizuye et al. (2013) observaram a ação antagônica de 26,7% dos isolados frente as bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumonia* e *Escherichia Coli*. Resultados semelhantes foram reportados anteriormente por Gurung et al. (2009), utilizando actinomicetos obtidos de amostras de solo do Monte Everest, frente a micro-organismos de interesse médico. Kesavan & Hemalatha (2015) em estudo de isolamento e seleção de actinomicetos produtores de antibióticos, isolados de amostras de solo da Índia, relatam que apenas o extrato bruto de uma cultura de actinomiceto foi ativa *in vitro* em razão da capacidade de inibir o crescimento dos patógenos Gram-negativos *K. pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. Coli*. Resultados semelhantes também foram observados em actinomicetos isolados de amostras de solo coletadas na Arábia Saudita (Geetanjali & Jain, 2016).

4.5.2 Avaliação temporal da atividade antibacteriana nos líquidos metabólitos dos isolados de actinomicetos

Os actinomicetos A 470, A 432 e KACP 35, selecionados na triagem primária, foram inoculados em dois tipos de meio de cultura, ISP-2 e M1. Utilizando o método de difusão de disco embebido no líquido metabólito obtido em diferentes períodos de incubação, verificou-se que os isolados de *P. ananatis* apresentaram, em média, maior sensibilidade ao líquido metabólito após incubação dos isolados de actinomicetos por 72 horas nos dois meios de cultura (Tabela 9). Isso indica que tais micro-organismos foram capazes de produzir substâncias antibacterianas nas condições avaliadas. Cunha et al. (2009) relatam que a estirpe de *Streptomyces sp.* quando fermentada por 72 h no meio ISP-2 produz metabólito com atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos com o emprego dos meios de cultura demonstram que o meio ISP-2 se destacou como o melhor meio para produção de substâncias bioativas quando comparado ao meio M1. Neste caso, a concentração de glicose pode ter interferido na

produção de compostos bioativos por causa da repressão de enzimas biossintéticas (Sanchez & Demain, 2002; Cunha et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados por Abbanat et al. (1999) que verificaram a interferência na produção do antibiótico pirroindomicina por *S. rugosporus* quando utilizaram concentração de glicose de 10%. Cunha et al. (2009) relatam que a concentração da fonte de carbono do meio de cultura influencia na produção de metabólitos bioativos.

Os micro-organismos do solo são fonte para o isolamento de diversos produtos biológicos importantes (Sanglier et al., 1993; Jeya et al., 2013; Kaur et al., 2014; Chanthasena & Nantapong, 2016). Sanglier et al., 1993 reportam que as substâncias produzidas pelo gênero *Streptomyces* apresentam grande diversidade química. Diversos autores relatam que apenas 1-3% de todos os compostos antimicrobianos conhecidos produzidos pelo gênero *Streptomyces* foram identificados e isolados, portanto; há uma grande variedade de antibióticos a serem descobertos (Baltz, 2005; Shetty et al., 2014; Chanthasena & Nantapong, 2016). Desse modo, torna-se importante a investigação dos metabólitos produzidos pelos isolados identificados como *S. pseudovenezuelae*, *S. novaecaesareae* e *S. laculatispora*.

Kaur et al. (2014) aconselharam a pesquisa de antibióticos produzidos por bactérias do solo, pois estes micro-organismos são onipresentes na natureza, de fácil manejo e comumente utilizados para a produção de antimicrobianos. Os metabólitos secundários sintetizados por actinomicetos, especialmente aqueles pertencentes ao gênero *Streptomyces*, possuem uma variedade de atividades biológicas que são amplamente utilizadas em tratamentos de doenças humanas e animais (Ômura et al., 2001; Euanorasetr et al., 2010) bem como de plantas (Behal, 2000; Ômura et al., 2001; Doumbou et al., 2001).

Tabela 9. Detecção de atividade antibacteriana utilizando líquido metabólito proveniente da inoculação dos isolados de actinomicetos A 470, A 432 e KACP 35 nos meios líquidos ISP-2 e M1 contra as estirpes fitopatogênicas de *Pantoea ananatis*.

Isolado	Espécie	Meio Líquido	Tempo (h)	Diâmetro do halo de inibição (mm)	
				Estirpe CMPC 40	Estirpe CMPC 105
A 470	<i>S. pseudovenezuelae</i>	ISP-2	24	0,00	0,00
			48	6,00 c	6,00 c
			72	10,00 a	11,00 a
			96	8,00 b	8,00 b
			120	8,00 b	7,00 b
		M1	24	0,00	0,00
			48	6,00 c	7,00 b
			72	10,00 a	10,00 a
			96	7,00 b	7,00 b
			120	7,00 b	7,00 b
A 432	<i>S. novaecaesareae</i>	ISP-2	24	0,00	0,00
			48	6,00 c	6,00 c
			72	10,00 a	10,00 a
			96	7,00 b	8,00 b
			120	7,00 b	7,00 b
		M1	24	0,00	0,00
			48	6,00 c	6,00 c
			72	9,00 a	9,00 a
			96	7,00 b	7,00 b
			120	7,00 b	6,00 c
KACP 35	<i>S. laculatispora</i>	ISP-2	24	0,00	0,00
			48	7,00 c	7,00 b
			72	9,00 a	10,00 a
			96	8,00 b	7,00 b
			120	7,00 c	7,00 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9. Continuação

Isolado	Espécie	Meio Líquido	Tempo (h)	Diâmetro do halo de inibição (mm)	
				Estirpe CMPC 40	Estirpe CMPC 105
KACP 35	<i>S. laculatispora</i>	M1	24	0,00	0,00
			48	6,00 b	6,00 b
			72	8,00 a	9,00 a
			96	6,00 b	6,00 b
			120	6,00 b	6,00 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.5.3 Prospecção e identificação de antibióticos produzidos por isolados de actinomicetos

A análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas para a identificação de substâncias antimicrobianas produzidas pelos isolados de actinomicetos A 470, A 432 e KACP 35 foi realizada após 72 horas de crescimento em meio líquido, pois apresentaram, em média, os maiores halos de inibição frente a *P. ananatis* quando comparados com os demais períodos (Tabela 9). Nesse método de análise, a detecção e confirmação de moléculas de antibióticos foi realizada pelo atendimento simultâneo de três critérios: 1) presença de dois íons (m/z) específicos de cada analito; 2) razão relativa entre a intensidade dos íons e 3) tempo de retenção quando comparados a um padrão (controle positivo).

Na análise foram utilizados um controle positivo feito pela fortificação do meio de cultura com uma solução padrão dos analitos pesquisados em concentração variável entre 15,0 e 500,0 µg/L, e um controle negativo (amostra branca) com a presença apenas do meio.

Os resultados das análises de cromatografia acoplada à espectrometria de massas dos extratos confirmaram a presença de antibióticos na amostra do meio líquido ISP-2 contendo o isolado de actinomiceto A 470, identificado molecularmente como *S. pseudovenezuelae*. Ômura et al. (2001), Ujikawa (2003) e Martín et al. (2005) relatam que a biossíntese de metabólitos é altamente influenciada pela disponibilidade de nutriente do meio de cultivo utilizado. Dessa forma, a ausência da produção de substância antimicrobiana no meio líquido M1 pode estar associada à sua composição química, resultando na produção de outras substâncias antimicrobianas não avaliadas nas análises por cromatografia acoplada à espectrometria de massas.

Na amostra proveniente do cultivo do isolado A 470 em meio ISP-2 foi identificada a presença de dois picos cromatográficos de transições m/z (T_1 : 485/163) e tempo de retenção (3,57 min) semelhantes àqueles apresentados pela canamicina no controle positivo (dados não mostrados). Ao comparar a razão entre a intensidade das duas transições ($T_2/T_1 = 0,5306$), quantitativa (T_1 /mais intensa) e confirmatória (T_2 /menos intensa), com aquela apresentada pelo controle positivo ($T_2/T_1 = 0,3519$), observou-se uma variação percentual maior que 30% para a amostra em questão. De acordo com Decisão da Comissão Europeia denominada 2002/657/DE, a qual estabelece os requisitos e critérios a serem atendidos na validação de métodos para confirmação de resíduos, a variação máxima permitida para a razão entre as transições é de 25%. Dessa forma, como os três critérios para a identificação da canamicina

nas amostras não foram simultaneamente atendidos, a presença desse analito não foi confirmada.

Conforme ilustrado na Figura 9, observou-se a presença de dois picos cromatográficos de transições m/z (T_1 : 615,3/161,3) e tempo de retenção (3,77 min) semelhantes àqueles apresentados pela neomicina no controle positivo (Figura 10). A razão entre as transições observada na amostra (T_2/T_1 : 0,3337) apresentou uma diferença de cerca de 5% com relação ao valor da razão da neomicina no controle positivo (T_2/T_1 : 0,3532) (dados não mostrados). Dessa forma, como os três critérios estipulados para a identificação do analito foram atendidos em sua totalidade, pode-se confirmar de forma inequívoca a presença da neomicina no meio fermentativo ISP-2 proveniente do metabolismo do isolado A 470.

Vale destacar que no ensaio de antibiograma (Tabela 7) a neomicina inibiu o crescimento de *P. ananatis*, comprovando a eficiência desta substância como agente antibacteriano frente a este fitopatógeno. Resultado similar foi observado por Sauer (2010), cujos os testes de resistência realizados em meio líquido TSB contendo o antibiótico sulfato de neomicina nas concentrações 0,4 mg/mL e 0,04 mg/mL foram capazes de inibir total ou consideravelmente o crescimento de isolados de *P. ananatis*.

A utilização do isolado A 470, identificado como *S. pseudovenezuelae*, como agente para o biocontrole de *P. ananatis* mostra-se altamente promissor. Entretanto, trabalhos futuros de validação deverão ser realizados em condições de casa de vegetação e campo.

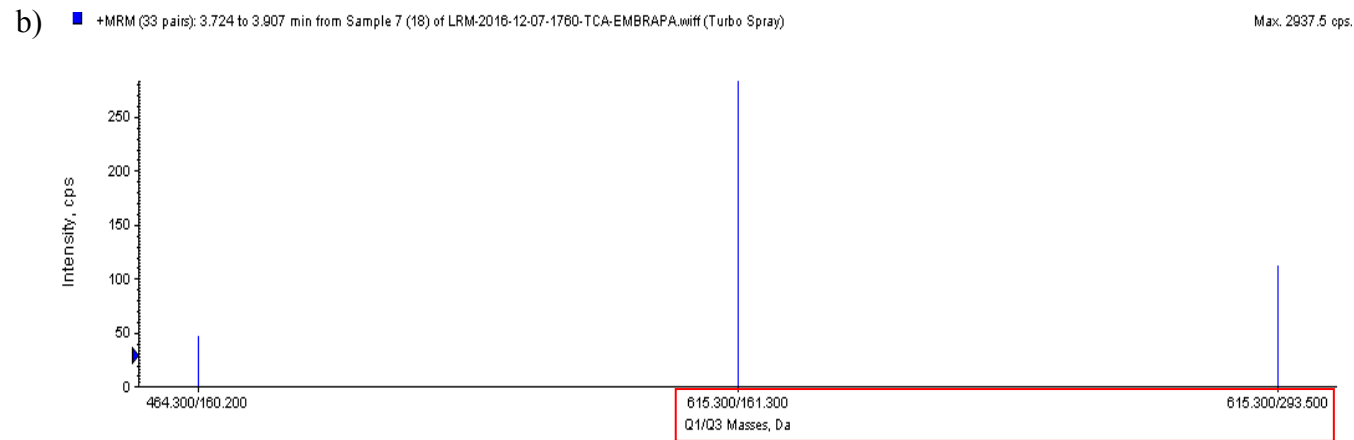
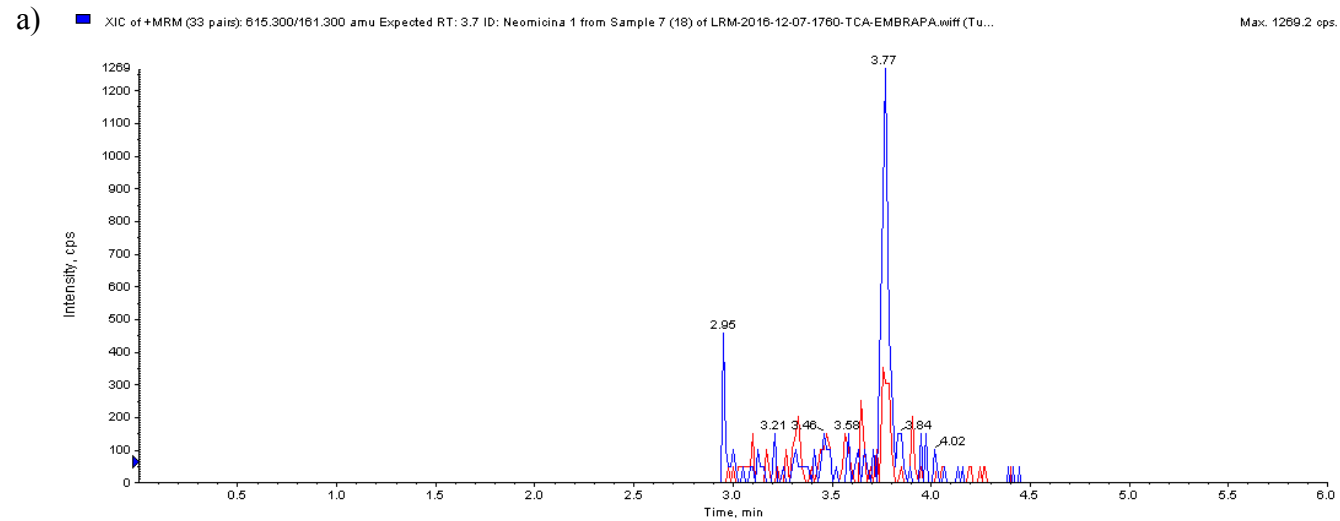


Figura 9. Identificação do antibiótico neomicina produzido pelo isolado de actinomiceto A 470 em meio ISP-2 após 72 h de incubação. a) Cromatograma com a identificação da neomicina (3,77 min) e b) Transições massa/carga (m/z) típicas da neomicina.

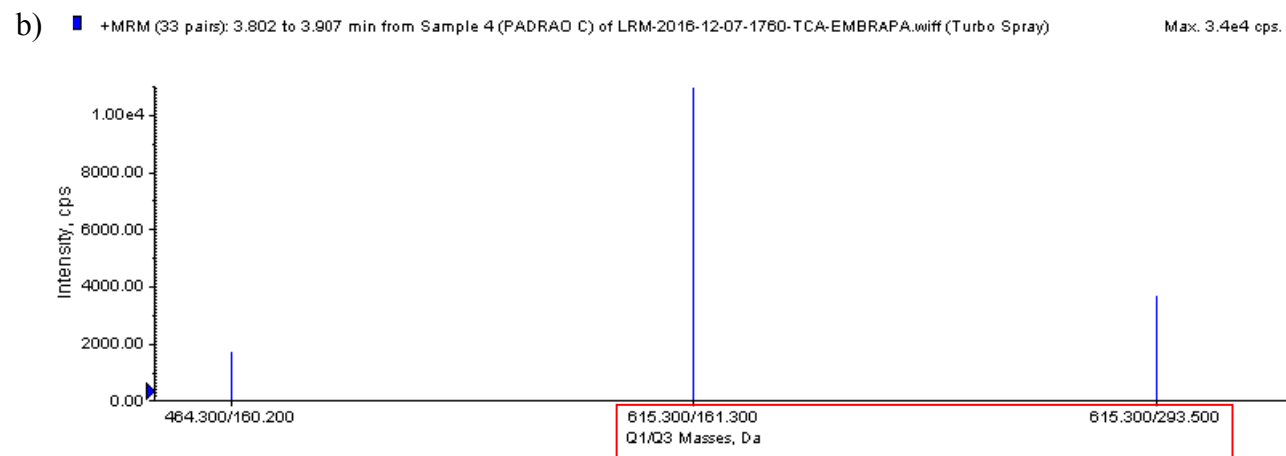
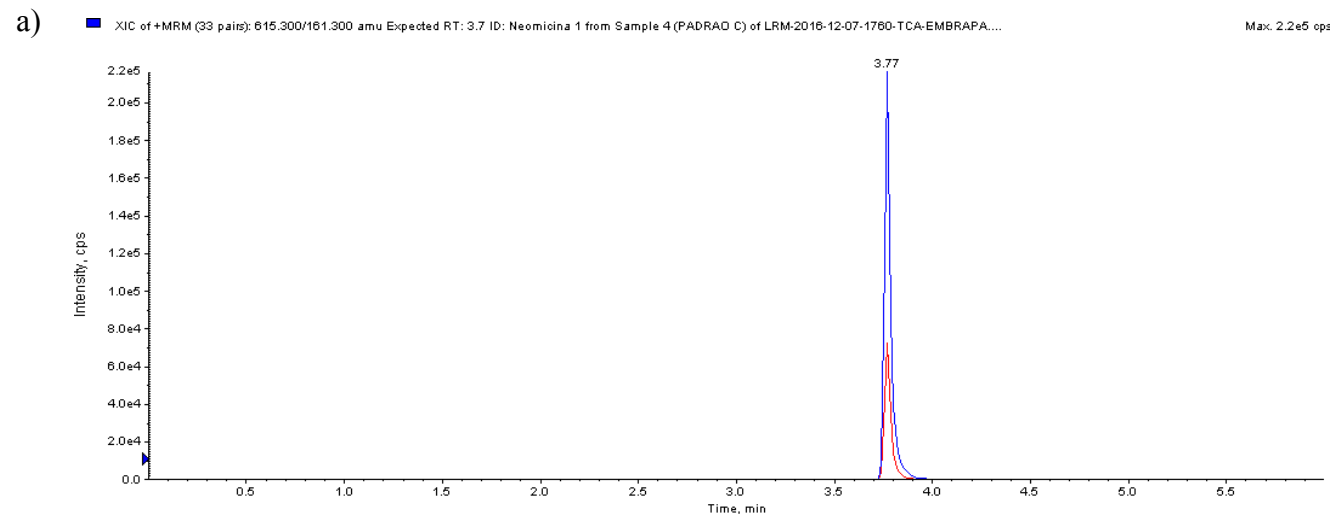


Figura 10. Perfil do antibiótico neomicina. a) Cromatograma da neomicina padrão (3,77 min) e b) Transições m/z referentes ao padrão (controle positivo).

5. CONCLUSÕES

- 1) Existe variabilidade genética inter e intraespecífica em populações de actinomiceto em relação às características morfológica, genética e produção de enzimas hidrolíticas.
- 2) O gênero *Streptomyces* é predominante nas amostras de actinomicetos da Coleção de Micro-organismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo.
- 3) A maioria dos isolados (95,7%) hidrolisa pelo menos um dos substratos utilizados para detecção de atividade enzimática, o que evidencia a produção de grande quantidade de metabólitos e o potencial biotecnológico destes micro-organismos para a provável síntese de enzimas de interesse industrial, tais como amilase, celulase e lipase.
- 4) Os isolados AM_SJ 45 (*S. curacoï*) e LD 6 (*S. hygrosopicus*) apresentam maior produção de amilase, AR_LJ 53 (*S. cyslabdanicus*) e AR_LJ 48 (*S. chiangmaiensis*) de celulase e LD 6 (*S. hygrosopicus*) de lipase.
- 5) As estirpes fitopatogências de *P. ananatis* avaliadas apresentam maior sensibilidade frente aos antimicrobianos norfloxacin e ciprofloxacina.
- 6) Os isolados de actinomicetos A 470 (*S. pseudovenezuelae*), A 432 (*S. novaecaesareae*) e KACP 35 (*S. laculatispora*) são capazes de inibir o crescimento da bactéria *P. ananatis in vitro* e apresentam potencial para utilização no controle biológico da mancha-branca do milho.
- 7) O isolado de actinomiceto A 470 produz o antibiótico neomicina em meio líquido que deve estar associado ao mecanismo de inibição do crescimento de *P. ananatis in vitro*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBANAT, D.W.; MAIESE; M. GREENSTEIN. Biosynthesis of the pyrroindomycins by *Streptomyces rugosporus* LL – 42D005; Characterization of nutrient requirements. **The Journal of Antibiotics**, v. 52, p. 117-126, 1999.

ABIMILHO - Associação brasileira das indústrias de milho, 2015. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>. Acesso em out. 2015.

ABRAMIC, M.; LESCIC, I.; KORICA, T.; VITALE, L.; SAENGER, W.; PIGAC, J. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 522-529, 1999.

AGHAMIRIAN, M. R.; GHIASIAN, S. A. Isolation and characterization of medically important aerobic actinomycetes in soil of Iran (2006 - 2007). **The Open Microbiology Journal**, v. 3, p. 53-57, 2009.

ALBUQUERQUE, U. S.; SALES, A. E.; TAKAKI, G. M. C.; MESSIAS, A. S.; SILVA, C. A. A. Detecção de amilase e uréase em bactérias mesofílicas isoladas de lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife – Pernambuco. **Exacta**, v. 8, n. 3, p. 289-298, 2010.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Londres: **Academic Press**. 1995, 576p.

ALVES, E. N. T. D.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, C. A.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; MATTOS, B. B.; VERDOLIN, A. L. G. **Seleção de microrganismos antagonistas para biocontrole de *Fusarium verticillioides* na cultura do milho (*Zea mays* L.)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013, 26p. (Boletim técnico, 75).

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMARAL, A. L.; CARLI, M. L.; NETO, J. F. B.; SOGLIO, F. K. *Phoma sorghina*, a new pathogen associated with *phaeosphaeria* leaf spot on maize in Brazil. **Plant Pathology**, v. 53, p. 259, 2004.

ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 351-367.

BAKER, K. F.; COOK R. J. *Biological control of plant pathogenes*. San Francisco: **W.H. Freeman**, 1974, 433p.

BALA, S.; KHANNA, R.; DADHWAL, M.; PRABAGARAN, S. R.; SHIVAJI, S.; CULLUM, J.; LAL, R. Reclassification of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 46095 as

Amycolatopsis rifamycinica sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1145–1149, 2004.

BALTZ, R. Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall?. **SIM News**, v. 55, n. 5, p. 186-196, 2005.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H. P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; VAN WEZEL, G. P. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. n. 80, p. 1-43, 2016.

BASILIO, A., GONZÁLEZ, I., VICENTE, M., GORROCHATEGUI, J., CABELLO, A., GONZÁLEZ, A.; GENILLOU, O. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 814–823, 2003.

BATISTA, W. B.; NOBRE, S. A. M; NOBRE, P. B.; FERNANDES, B. H. A.; GOMES, H. A. R.; AGUIAR, R. M.; MELO, G. A.; PEREIRA, G. V. N. Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon sculentum*) de diferentes cultivares. **Unimontes Científica**, v.12, n.1/2, p. 60-69, 2010.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEHAL, V. Bioactive products from *Streptomyces*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 47, p. 113-157, 2000.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 557-574, 2001.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.) Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna: **EMBRAPA**, 1991, 388p.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose Degrading Enzymes and their Potential Industrial Applications. **Biotechnol Advances**, v. 15, ns. ¾, p. 583–620, 1997.

BIZUYE, A.; MOGES, F.; ANDUALEM, B. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 5, p. 375-381, 2013.

BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; JÚNIOR, N. S. M; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W, F.; CASELA, C. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 63-66, 2008.

BORGES, T. K. S.; MONTENEGRO, A. A. A.; SANTOS, T. E. M.; SILVA, D. D.; JUNIOR, V. P. S. Influência de práticas conservacionistas na umidade do solo e no cultivo do milho (*Zea mays* L.) em semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 1862-1873, 2014.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n.1, p.73-81, 2002.

BRITO, A. H.; PINHO, R. G. V.; FILHO, A. X. S.; ALTOÉ, T. F. Avaliação da severidade da cercosporiose e rendimento de grãos em híbridos comerciais de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 7, n.1, p. 19-31, 2008.

BRITO, A. H.; PINHO, R. G. V.; SANTOS, A. O.; SANTOS, S. Reação de híbridos de milho e comparação de métodos para avaliação da cercosporiose e mancha-branca. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n.1, p. 35-41, 2011.

BRITO, A. H.; PINHO, R. G. V.; PEREIRA, J. L. A. R.; BALESTRE, M. Controle químico da cercosporiose, mancha-branca e grãos ardidos em milho. **Revista Ceres**, v. 60, n.5, p. 629-635, 2013.

CARDOSO, E. J. B. N. Relações ecológicas entre microrganismos. In: GALLI, F. (Ed.). Manual de fitopatologia. 2ª ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**. v. 1, 1978. p. 26-51.

CARLI, M. L. **Aspectos etiológicos e epidemiológicos do complexo mancha-branca do milho**. 2008. 87p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; AMARAL, L. S.; GARCIA, F. A. O. Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 340-344, 2009.

CARSON, M. L. Yield loss potential of phaeosphaeria leaf spot of maize caused by *Phaeosphaeria maydis* in the United States. **Plant Disease**, v. 89, p. 986-988, 2005.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006, 14p. (Circular técnica, 83)

CERVELATTI, E. P.; PAIVA, E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; TEIXEIRA, F. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of *Phaeosphaeria* leaf spot in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 3, p. 30-37, 2002.

CHALLIS, G. L. & HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 14555-14561, 2003.

CHANTHASENA, P. & NANTAPONG, N. Biodiversity of antimicrobial-producing actinomycetes strains isolated from dry dipterocarp forest soil in northeast Thailand. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-11, 2016.

CHAUDHARY, H. S.; SONI, B.; SHRIVASTAVA, A. R.; SHRIVASTAVA, S. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 83-94, 2013.

CHOI, D. B.; TAMURA, S.; PARK, Y. S.; OKABE, M.; SERIU, Y.; TAKEDA, S. Efficient tylosin production from *Streptomyces fradiae* using rapeseed oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 183-186, 1996.

CHUNG, Y. R.; SUNG, K. C.; MO, H. K.; SON, D. Y.; NAN, J. S.; CHUN, J.; BAE, K. S. *Kitasatospora cheerisanensis* sp. nov., a new species of the genus *Kitasatospora* that produces an antifungal agent. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 753-758, 1999.

CLAESSEN, D.; JONG, W. D.; DIJKHUIZEN, L.; WOSTEN, H. A. B. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 313-319, 2006.

COHEN, Y.; COFFEY, M. D. Systemic fungicides and the control of oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 311-318, 1986.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito antagônico de actinomicetos isolados de ervas daninhas e gramíneas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol. 10, n. 2, p. 144-153, 2010.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, **Acompanhamento de safra brasileira: grãos: safra 2015/2016: primeiro levantamento: outubro/2010**. Brasília, 2015. 156p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_10_16_10_52_19_safras_outu_2015.pdf>. Acesso em: out. 2015.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, **Séries históricas**. Brasília, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos>. Acesso em: nov. 2016.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COOMBS, J. T.; MICHELSEN, P. P.; FRANCO, C. M. M. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* in wheat. **Biological Control**, v. 39, p. 359-366, 2004.

COON, H. J.; JENNISON, M. W.; WEEK, O. B. Routine tests for the identification of bacteria. In: **Manual of Microbiological Methods** (ed. Society of American Bacteriologists). New York: McGraw-Hal, 1957. p. 239-262.

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Doenças. In: CRUZ, J. C. (Ed.). Cultivo do milho. 6ª ed. **Sistema de produção 2**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2010.

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; LANZA, F. E. **Recomendações para o controle químico da mancha-branca do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011, 6p. (**Circular técnica**, 167).

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; LANZA, F. E.; FIGUEIREDO, J. E. F. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-branca do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 11, n.3, p. 291-301, 2012.

COSTA, R. S.; MÔRO, F. V.; SILVA, H. P.; PANIZZI, R. C. Relação entre características morfológicas da cariopse e fusariose em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n.1, p. 27-33, 2003.

COTA, L. V.; COSTA, R. V.; SILVA, D. D.; PARREIRA, D. F.; LANA, U. G. P.; CASELA, C. R. First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 5, p. 120-122, 2010.

COUTO, C. M. C. M.; M. MONTENEGRO, C. B. S. M.; REIS, S. Complexação da tetraciclina, da oxitetraciclina e da clortetraciclina com o catião cobre (II). Estudo potenciométrico. **Química Nova**. 2000, p. 457-460.

CRAWFORD, D. L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: GOODFELLOW M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. (Eds). Actinomycetes in biotechnology. London: **Academic Press**, 1988.

CUNHA, I. G. B.; SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, R. E. A.; AMORIM, E. L. C.; ARAUJO, J. M. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 120-123, 2009.

Decisão da Comissão (EEC) N° 2002/657/CE de 12 de agosto de 2002. **Official Journal of the European Union**. L221, 2002. p. 8-36.

DING, C. H.; JIANG, Z. Q.; LI, X. T.; LI, L. T.; KUSAKABE, I. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E- 86. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 7-10, 2004.

DING, L.; HIROSE, T.; YOKOTA, A. *Amycolatopsis echigonensis* sp. nov. and *Amycolatopsis niigatensis* sp. nov., novel actinomycetes isolated from a filtration substrate.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.57, p. 1747–1751, 2007.

DOUMBOU, C. L.; HAMBY SALOVE, M. K.; CRAWFORD, D. L.; BEAULIEU, C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection**, v. 82, n 3, p. 85-102, 2001.

DURAN, N.; TEIXEIRA, M. F. S.; ESPOSITO, E. Ecological-Friendly pigments from fungi. **Food Science**, v. 42, p. 55-66, 2002.

ECCLESTON, G. P.; BROOKS, P. R.; KURTBÖKE, D. I. The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the Sunshine Coast in Australia. **Marine Drugs**, v. 6, p. 243-261, 2008.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, **Manejo da cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006, 12p. (Circular técnica, 87)

ESMERINO, L. A.; GONÇALVES, L. G.; SCHELESKY, M. E. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas *Escherichia coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, p. 31-39, 2003.

EUANORASETR, J.; NILVONGSE, A.; TANTIMAVANICH, S.; NIHIRA, T.; IGARASHI, Y.; PANBANGRED, W. Identification and characterization of soil-isolated *Streptomyces* SJE177 producing actinomycin. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 41, n. 5, p. 1177-1187, 2010.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. 2.ed. Guaíba: **Agropecuária**, 2004, 360p.

FANTIN, G. M. Mancha de *Phaeosphaeria*, doença do milho que vem aumentando sua importância. **Biológico**, São Paulo, v. 56, n. 1/2, p. 39, 1994.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 1997. 80p. (Circular técnica, 26).

FERREIRA, D.F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. DEX. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FILHO, R. C.; ROMEIRO, R. S.; AMARAL, L. S.; GARCIA, F. A. O. Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n.3, p. 340-344, 2009.

FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; MARTINS, M. C. Isolamento, caracterização cultural-morfológica, patogenicidade e serologia de *Streptomyces* spp. da batata. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.650-655, 2003.

- FLÄRDH, K.; BUTTNER, M. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature**, v.7, p. 46-49, 2009.
- FLORES, M. E.; PÉREZ, R.; HUITRÓN, C. β -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 410-416, 1997.
- GAVA, C. A. T.; PEREIRA, J. C.; FERNANDES, M. C.; NEVES, M. C. P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1373-1380, 2002.
- GEETANJALI & JAIN, P. Antibiotic production by rhizospheric soil microflora – a review. **International Journal of Pharmaceutical sciences and Research**, v. 7, n 11, p. 4304-4314, 2016.
- GODFREY, T.; WEST, S. I. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey, T. (Ed.). **Industrial Enzymology**. 2^a ed., London: Macmillan Press, 1996. p. 120-138.
- GONÇALVES, R. M.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PEDRO, E. S.; MEIRELLES, W. F.; LEITE JUNIOR, R. P.; SAUER, A. V.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Etiology of *Phaeosphaeria* leaf spot disease of maize. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 3, p. 559-569, 2013.
- GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. **Actinomycetes in Biotechnology**. London: Academic Press, 1988.
- GRIGOLETTI JUNIOR, A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v.30, n.1/2, p. 155-165, 2000.
- GURUNG, T. D.; SHERPA, C.; AGRAWAL, V. P.; LEKHAK, B. Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. **Nepal Journal Science and Technology**, v. 10, p. 173-182, 2009.
- HACÈNE, H.; DAOUDI-HAMDAD, F.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; LEFEBVRE, G. H107, a new aminoglycoside anti-Pseudomonas antibiotic produced by a new strain of *Spirillospora*. **Microbios**, v. 102, p. 69-77, 2000.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, n.8, p.3233-3241, 1997.
- HODKINSON, B. P.; LUTZONI, F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. **Symbiosis**, v. 49, p. 163-180, 2009.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; WILLIAMS, S. T. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Baltimore: **Lippincott Williams & Wilkins**, 1994, 787p.

HOLT, J.G.; WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: **Williams & Wilkins**. 1989, 2648p.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. (Ed.). **Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: Rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2011, 20p. (Documentos, 333).

JEYA, K.; KIRUTHIKA, K.; VEERAPAGU, M. Isolation of antibiotic producing *Streptomyces* sp. from soil of Perambalur district and a study on the antibacterial activity against clinical pathogens. **International Journal of PharmTech Research**, v. 5, p. 1207-1211, 2013.

JULIATTI, F. C.; BELOTI, I. F.; JULIATTI, B. C. M.; CRATO, F. F. Eficácia da associação de fungicidas e antibióticos no manejo da mancha-branca do milho e seu efeito na produtividade. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1622-1630, 2014.

KARANJA, E. N.; BOGA, H.I.; MUIGAI, A.W.; WAMUNYOKOLI, F.; KINYUA, J.; NONOH, J.O. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel *Streptomyces* species from Kenyan soils. **Scientific Conference Proceedings**, p. 17-30, 2010.

KAUR, S.; KAUR, J.; PANKAJ, P. P. Isolation and characterization of antibiotic producing microorganisms from soil samples of certain area of Punjab region of India. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 4, p. 312-315, 2014.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74, n. 1-3, p. 65-76, 1999.

KESAVAN, S. S. S. & HEMALATHA, R. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from garden soil of Sathyabama University, Chennai. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 6, p. 110-114, 2015.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.

KLYOSOV, A. A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. **Journal of Biochemistry**, v. 29, n. 47, p. 10577-10585, 1990.

LABEDA, D. P.; DONAHUE, J. M.; WILLIAMS, N. M.; SELLS, S. F.; HENTON, M. M. *Amycolatopsis kentuckyensis* sp. nov., *Amycolatopsis lexingtonensis* sp. nov. and *Amycolatopsis pretoriensis* sp. nov., isolated from equine placentas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1601–1605, 2003.

- LAIDI, R. F.; KANSOH, A. L.; ELSHAFEI, A. M.; CHEIKH, B. Taxonomy, identification and biological activities of a novel isolate of *Streptomyces tendae*. **Arab Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 427-436, 2006.
- LAJOLO, F. M. & MENEZES, E. W. Carbohidratos en alimentos regionales Iberoamericanos. São Paulo: **Universidade de São Paulo**. 2006, 648p.
- LANA, U. G. P.; GOMES, E. A.; SILVA, D. D.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; SOUZA, I. R. P.; GUIMARÃES, C. T. Detection and molecular diversity of *Pantoea ananatis* associated with white spot disease in maize, sorghum and crabgrass in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 441-448, 2012.
- LANA, U. G. P.; SOUZA, I. R. P.; NODA, R. W.; PASTINA, M. M.; MAGALHÃES, J. V.; GUIMARÃES, C. T. Quantitative Trait Loci and Resistance Gene Analogs Associated With Maize White Spot Resistance. **Plant Disease**, v. 1, p. 200-208, 2016.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-18, 2010.
- LANZA, F. E.; ZAMBOLIM, L.; CASELA, C. R.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; FIGUEIREDO, J. E. F. Etiology and epidemiological variables associated with maize resistance to white spot disease. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 2, p. 349-359, 2013.
- LARGE, K. P.; MIRJALILI, K.; OSBORNE, M.; PEACOCK, L. M.; ZORMPAIDIS, V.; WALSH, M.; CAVANAGH, M. E.; LEADLAY, P. F.; ISON, A. P. Lipase activity in *Streptomyces*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 569-575, 1999.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348-352, 1994.
- LEWIS, K. J. **Biological control mechanism of the mycoparasitae *Phytophthora oligandrum* Dreschler**. 1988. Dissertação (Doutorado). University of Sheffield, Sheffield.
- LUZ, B. D. S.; BICAS, J. L.; SARROUH, B.; LOFRANO, R. C. Z. Bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Brasil. **Interbio**, v. 10, n. 1, p. 13-24, 2016.
- MACIEL, C. G.; LAZAROTTO, M.; MEZZOMO, R.; POLETTI, I.; MUNIZ, M. F. B.; LIPPERT, D. B. *Trichoderma* spp no biocontrole de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de *Eucalyptus saligna*. **Revista Árvore**, v. 36, n. 5, p. 825-832, 2012.
- MAHESHWARI, D. K.; DUBEY, R. C.; SARAVANAMURTHU, R. **Industrial Exploitation of Microorganisms**. India: I.K. International Publishing House, 2010.

MALAGI, G.; SANTOS, I.; CAMOCHENA, R. C.; MOCELLIN, R. Elaboração e validação da escala diagramática para avaliação da mancha-branca do milho. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 797-804, 2011.

MANERBA, F. C.; SOUZA, P. E.; PINHO, R.G.; DORNELAS, G. A.; MONTEIRO, F. P. Antibióticos no controle da mancha-branca do milho. **Comunicata Scientiae**, V. 4, n. 4, p. 361-367, 2013.

MANSFIELD, S. D.; MEDER, R. Cellulose Hydrolysis – the Role of Monocomponent Cellulases in Crystalline Cellulose Degradation. **Cellulose**, v.10, p. 159–169, 2003.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO, **Culturas-Milho**. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>> Acesso em: Mar. 2016.

MARGALITH, P. Z. Pigment Microbiology. London: **Chapman & Hall**. 1992, 156 p.

MARIANO, R, L, R., Método de Seleção in vitro para o controle microbiológico de patógeno de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p. 369-409, 1993.

MARTINEZ, R.; GIRONI, R. H. A. R.; SANTOS, V. R. dos. Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos, usados na prática médica - Ribeirão Preto - SP - 1994. **Medicina**, v. 29, p. 278-284, 1996.

MATSUURA, T. **Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.)**. 2004. 68p. Dissertação (Doutorado) – Universidade de Campinas, Campinas.

McCARTHY, A. J. & WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. **Gene**, v. 115, p. 189-192, 1992.

McNEIL, M. M.; BROWN, J. M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 3, p. 357-417, 1994.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. (Ed.). Controle biológico. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 1998, 57p.

MELO, I. S. & VALARINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum*). **Scientia Agrícola**, v.52, n.2, p.326-330, 1995.

MICHEREFF, S. J. Fundamentos de fitopatologia. In: MICHEREFF, S. J. **Controle biológico de doenças de plantas**. Recife: UFRPE, 2001. p. 124-129.

MIRANDA, G. V.; SANTOS, I. C.; GALVÃO, J. C. C.; PAULA JUNIOR, T. J. Milho (*Zea mays* L.). In: PAULA JUNIOR, T. J.; VENZON, M. **101 Culturas: Manual de Tecnologias Agrícolas**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2007. p. 537 – 552.

MOHAMED, H. S.; ALTALHI, A. D.; EL-ZAHRANI, G. S. B.; SADIK, A. S. Enzymatic activities of some streptomycetes isolated from soil at Taif region. **International Journal of Current Microbiology and Applied sciences**, v. 4, n. 2, p. 19-32, 2015.

MOHANTA, Y. K. Isolation of cellulose-degrading actinomycetes and evaluation of their cellulolytic potential. **Bioengineering and Bioscience**, v. 2, p. 1-5, 2014.

MONTEIRO, C.; CREPALDI, R. M. C.; AVELAR, A. F. M.; PETERLINI, M. A. S.; PEDREIRA, M. L. G. Potencial hidrogeniônico de soluções de antibióticos submetidas a condições ambientais: ensaio preliminar. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, n. 2, p. 311-319, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: **UFLA**, 2002, 626p.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: **UFLA**, 2006, 729p.

MOURA, A. B. & ROMEIRO, R. S. Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 2, p. 281-288, 1999.

MURAMATSU, H.; MURAKAMI, R.; IBRAHIM, Z. H.; MURAKAMI, K.; SHAHAB, N.; NAGAI, K. Phylogenetic diversity of acidophilic actinomycetes from Malaysia. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, P. 621–624, 2011.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 4^a ed. Approved standard M2-A4. NCCLS, Villanova, 1990.

NEU, H. C. The Crisis in Antibiotic Resistance. **Science**, v. 257, p. 1064-1073, 1992.

NITHANGENI, M. B.; PATTERTON, H. G.; TANDER, A. V.; VERGEER, W. P.; LITTHAUER, D. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. **Enzyme Microbial Technology**, v. 28, p. 705-712, 2001.

NITHYA, B.; PONMURUGAN, P.; FREDIMOSE, M. 16S rRNA phylogenetic analysis of actinomycetes isolated from Eastern Ghats and marine mangrove associated with antibacterial and anticancerous activities. **Journal of the Nigerian Association of Mathematical Physics**, v. 11, n. 60, p. 12379-12388, 2012.

NORDLUND, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v. 17, n. 2, p. 35-44, 1996.

OCHI, K.; HIRANUMA, H. A taxonomic review of the genera *Kitasatospora* and *Streptoverticillium* by analysis of ribosomal protein AT-L30. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, p. 285-292, 1994.

O'DONNELL, A. G. **Recognition of novel actinomycetes**. In: M. GOODFELLOW, S. T. WILLIAMS, M. MORDARSKI. (Ed.). **Actinomycetes in biotechnology**. London: Academic Press, 1988. p. 69-88.

OGUNMWONYI, I. H.; MAZOMBA, N.; MABINYA, L.; NGWENYA, E.; GREEN, E.; AKINPELU, D. A.; OLANIRAN, A. O.; BERNARD, K.; OKOH, A. I. Studies on the culturable marine actinomycetes isolated from the Nahoon beach in the Eastern Cape Province of South Africa. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 21, p. 2223-2230, 2010.

OKA, H.; IKAI, Y.; HAYAKAWA, J.; MASUDA, K.; HARADA, K.; SUZUKI, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics; part XIX: determination of tetracycline antibiotics in milk by liquid chromatography and thin-layer chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry. **Journal Association of Official Analytical Chemists International**, v. 77, n. 4, p. 891-894, 1994.

OLIVEIRA, S. R. **Atividade antagônica de actinomicetos contra *Botrytis cinerea*, patógeno da videira (*Vitis* sp)**. 2004. 60p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

ÔMURA, S.; TAKAKASHI, Y.; IWAI, Y.; TANAKA, H. *Kitasatospora*, a new genus of the order Actinomycetales. **Journal of Antibiotic**, v. 35, p. 1013-1019, 1982.

ÔMURA, S.; IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A.; TAKAHASHI, C.; SHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; HORIKAWA, H.; NAKAZAWA, H.; OSONOE, T.; KIKUCHI, H.; SHIBAI, T.; SAKAKI, Y.; HATTORI, M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 98, n. 21, p. 12215-12220, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; FERREIRA, A. S.; MEIRELLES, W. F.; MARRIEL, I. E.; CASELA, C. R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 5, p. 275-279, 2001.

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998, p.327-343.

PAN, S. C.; BONANNO, S.; WAGMAN, G. H. Efficient utilization of fatty oils as an energy source in penicillin fermentations. **Applied Microbiology**, v.7: p. 176-180, 1959.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in Microbial Amylases. **Biotechnology Applied and Biochemical**, v. 31, p. 135–152, 2000.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, V. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PEDRO, E. dos S.; GONÇALVES, R. M.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Produtos de diferentes grupos químicos no controle da mancha-branca do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, suplemento 1, p. 2981-2984, 2012.

PEGORARO, D. G; VACANO E.; NUSS, C. N.; DAL SOGLIO, F. K.; SERENO, M. J. C. M.; BARBOSA NETO, J. F. Efeito da época de semeadura e adubação na mancha-foliar de *phaeosphaeria* em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 1037-1042, 2001.

PEREIRA, J. C. **Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera**. 2000. Rio de Janeiro: Seropédica (Documentos, 118).

PEREIRA, A. O. P.; CAMARGO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho (*Zea mays*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO; A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. Piracicaba: Ceres, 2005. p. 477-488.

PINHO, R.G.; RAMALHO, M. A. P.; RESENDE, I. C.; SILVA, H. P.; POZAR, G. Reação de híbridos comerciais de milho às ferrugens polissora e tropical. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n.3, p.439-445, 2001.

PINTO, N. F. J. A. Controle químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 1, p. 134-138, 2004.

PINTO, N. F. J. A. & FERNANDES, F. T. Avaliação de fungicidas no controle da mancha-foliar de milho causada por *Phyllosticta* sp. (*Phaeosphaeria maydis*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 333. 1995.

PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Milho (*Zea mays* L.): Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: Grandes Culturas**. Viçosa: UFV, 1997. p. 821 – 864.

POZAR, G.; BUTRUILLE, D.; DINIZ, H. S.; VIGLIONI, J.P. Mapping and validation of quantitative trait loci for resistance to *Cercospora* infection in tropical maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.118, p. 553-564, 2009.

PRIDHAM, T. G. & LYONS, A. J. Jr. *Streptomyces albus* (Rossi Doria) Waksman et Henrici: Taxonomic study of strains labeled *Streptomyces albus*. **Journal of Bacteriology**, v. 81, p. 431-441, 1961.

RAHMAN, A.; ISLAM, M. Z.; ISLAM, A. U. Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D. L.; HERTEL, G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.12, p.3057-3063, 1998.

RAMÍREZ, P. & COHA, J.M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización e determinación de la actividad celulolítica. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 1, p. 67-77, 2003.

RANE, M. S.; PAYAK, M. M.; RENFRO, B. L. A *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Indian Phytopathology Society Bulletin**, v. 3, p. 8-10, 1966.

ROBBS, C. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. (Org.) Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, 1991. p. 338.

RODRIGUES, K. **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos**. 2006. 129p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROLIM, G. S.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; FANTIN, G. M.; BRUNINI, O.; DUARTE, A. P.; DUDIENAS, C. Modelo agrometeorológico regional para estimativa da severidade da mancha de *Phaeosphaeria* em milho safrinha no Estado de São Paulo, Brasil. **Bragantia**, v. 66, n.4, p. 721-728, 2007.

ROMANO, M. R. **Desempenho fisiológico da cultura de milho com plantas de arquitetura contrastante: parâmetros para modelos de crescimento**. 2005. 100p. Dissertação (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ROTHROCK, C. S. & GOTTLIEB, D. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 30, p. 1440-1447, 1984.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

RUELA, I. C.A.; LIMA, J. A.; SOUZA, S. V. C; JUNQUEIRA, R. G. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 139-146, 2005.

SAADOUN, I.; HAMEED, K. M.; MOUSSAUUI, A. Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. **Microbios**, v. 99, p.173-179, 1999.

SAGOVA-MARECKOVA, M.; ULANOVA, D.; SANDEROVA, P.; OMELKA, M.; KAMENIK, Z.; OLISOVSKA, J.; AND KOPECKY, J. Phylogenetic relatedness determined between antibiotic resistance and 16S rRNA genes in actinobacteria. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 81, p. 1-13, 2015.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 3, 2009.

SAHILAH, A. M.; TANG, S. Y.; ZAIMAWATI, M. N.; ROSNAH, H.; UMI KALSUM, M. S.; SON R. Identification and characterization of actinomycetes for biological control of bacterial wilt of *Ralstonia solanacearum* isolated from tomato. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 38, n. 1, p. 103-114, 2010.

SANCHEZ, S. & DEMAINE, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 895-906, 2002.

SANGLIER, J.; HAAG, H.; HUCK, T.; FEHR, T. Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988–1992). **Research in Microbiology**, v. 144, n. 8, p. 633-642, 1993.

SAUER, A. V. **Monitoramento e caracterização da população epifítica de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha-branca do milho**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SAUER, A. V.; ROCHA, K. R.; GONÇALVES, R. M.; MEIRELLES, W. F.; FIGUEIREDO, J. E. F.; MARRIEL, I. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Survival of *Pantoea ananatis*, causal agent of maize white spot disease in crop debris. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 1, p. 21 - 24, 2015.

SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMI, G. W. Identification of potential fungal strains for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 564-568, 2007.

SCHUELTER, A. R.; SOUZA, I. R. P.; TAVARES, F. F.; SANTOS, M. X.; OLIVEIRA, E.; GUIMARÃES, C. T. Controle genético da resistência do milho à mancha por *Phaeosphaeria*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 1, p. 80-86, 2003.

SELVAM, K.; VISHNUPRIYA, B.; SUBHASH, C. B. V. Screening and Quantification of Marine Actinomycetes Producing Industrial Enzymes Amylase, Cellulase and Lipase from South Coast of India. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 2, n. 5, p. 1481-1487, 2011.

SELVAMEENAL, L.; RADHAKRISHNAN, M.; BALAGURUNATHAN, R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. **Indian Journal Pharmaceutical Science**, v. 71, p. 499-504, 2009.

SÊMEDO, L. T. A. S.; LINHARES, A. A.; GOMES R. C.; MANFI, G. P.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO R. R. R. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Microbiology Research**, v. 155, n. 4, p. 291-299, 2001.

SERVIN, J. A.; HERBOLD, C. W.; SKOPHAMMER, R. G.; LAKE, J. A. Evidence excluding the root of the tree of life from the actinobacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1-4, 2008.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Avaliação de bactérias endofíticas para o controle biológico da mancha-foliar de *Exserohilum turcicum* em milho. **Plant Pathology**, v. 82, p. 1-4, 2015.

SILVA, E. C.; SENA, K. X. DA F. R.; ANDRADE, M. S. A. S.; OLIVEIRA, T. J. G.; FILHO, A. A. S. Primeiras observações sobre o antagonismo *in vitro* do *Streptomyces* sp. IA-10493 dirigido a fungos fitopatogênicos. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 22, p. 121-125, 1984.

SILVA, E. G.; MOURA, A. B.; DEUNER, C. C.; FARIAS, D. R. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Revista Ceres**, v. 55, n. 5, p. 377-383, 2008.

SILVA H. S. A., ROMEIRO R. S.; MOUNTEER A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n. 1, p. 42-46, 2003.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and enzyme activities. **Biological Control**, v.29, p.288-295, 2004.

SILVA, J. S.; COIMBRA, J. L.; TAVARES, D. G.; AFONSO, G. O. Inibição *in vitro* do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizando isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas nativas do cerrado baiano. **Natureza on line**, v. 11, n. 1, p. 15-19, 2013.

SILVA, L. C. B. **Identificação de actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. isolados do processo de compostagem para a produção de *Agaricus brasiliensis***. 2010. 89 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, V. M. A.; BRITO, F. A. E.; RAMOS, K. A.; SILVA, R. M.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade Enzimática de Actinobactérias do Semiárido. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 560-572, 2015.

SILVA, W. A. da; CABRAL, J. S. R.; SOUSA, D. S.; LIMA, R. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; CASELA, R.; MEIRELLES, W. F.; PEREIRA, F. C. Milho: Mancha-branca. **Revista Cultivar**, v. 11, n. 116, p. 16-18, 2009. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/58526/1/Mancha-branca.pdf>>. Acesso em: 29/12/2016.

SINGH, S.; KUMAR, P.; GOPALAN, N.; SHRIVASTAVA, B.; KUHAD, R. C.; CHAUDHARY, H. S. Isolation and partial characterization of actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 1147-50, 2012.

SIQUEIRA, J. O. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Brasília. **Ministério da Educação**, 1988, 118p.

SHETTY, P. R.; BUDDANA, S. K.; TATIPAMULA, V. B.; NAGA, Y. V. V.; AHMAD, J. Production of polypeptide antibiotic from *Streptomyces parvulus* and its antibacterial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n 1, p. 303-312, 2014.

SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of systematic bacteriology**, v.16, p.313-340, 1966.

SOLANKI, R.; KHANNA, M.; LAL, R. Bioactive compounds from marine actinomycetes. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 410-31, 2008.

SOMMER, P.; BORMANN, C.; GOTZ, F. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3553 – 3560, 1997.

SOUZA, F. J. N. **Obtenção por tratamento com N-metil C. N. *Streptomyces capoamus* DAUFPE-M3123 produtor do complexo ciclamino.** 1993. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

STACH, J. E. M.; MALDONADO, L. A.; MASSON, D. G.; WARD, A. C.; GOODFELOW, M.; BULL, A. T. Statistical Approaches for Estimating Actinobacterial Diversity in Marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6189-6200, 2003.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; ARAÚJO, J. M. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L.Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de *Guinardia* spp por meio de marcadores RAPD e sequências ITS.** 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SUNEETHA, V.; RAJ, K.; PRATHUSHA, K. Isolation and identification of *Streptomyces* ST1 and ST2 strains from Tsunami affected soils: Morphological and biochemical studies. **Journal of Oceanography and Marine Science**, v. 2, p. 96-101, 2011

SUTTON, S. Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density. **Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter**, v. 12, n. 8, p. 1-13 2006.

SUZUKI, K.; NAGAI, K.; SHIMIZU, Y. & SUZUKI, Y. Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. **Actinomycetologica**, v. 8, p. 122-127, 1994.

TADDEI, A.; RODRÍGUEZ, M. J.; MÁRQUEZ-VILCHEZ, E.; CASTELLI, C. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. **Microbiology Research**, v. 161, p. 222-231, 2006.

TAGUCHI, S.; KIKUCHI, H.; SUZUKI, M.; KOJUMA, S.; TERABE, M.; MIURA, K. I.; MOMOSE, H. *Streptomyces subtilisin* inhibitor-like proteins are distributed widely in Streptomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4338-4341, 1993.

TAKAHASHI, Y. Genus Kitasatospora, taxonomic features and diversity of secondary metabolites. **The Journal of Antibiotics**, p. 1-8, 2017.

TAKAHASHI, Y.; IWAI, Y.; ÔMURA, S. Two new species of the genus Kitasatospora, *Kitasatospora phosulacinea* sp. nov. and *Kitasatospora griseola* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 30, p. 377-387, 1984.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p.2731-2739, 2011.

TANYILDIZI, M. S.; OZER, D.; ELIBOL, M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2291-2296, 2005.

TESCH, C.; NIKOLEIT, K.; GNAU, V.; GOTZ, F.; BORMANN, C. Biochemical and molecular characterization of the extracellular esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 1858 – 1865, 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10^a ed. Porto Alegre: **Artemed**, 2012, 934p.

TRISSEL, L. A. Drug stability and compatibility issues in drug delivery. In: Trissel LA. Handbook of injectable drugs. 11^a ed. Bethesda: **American Society of Health-System Pharmacists**; 2001.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 327–338, 1999.

UJIKAWA, K. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 149-158, 2003.

VAN DER SAND, S. T.; MINOTTO, E.; MILAGRE, L.P.; OLIVEIRA, M.T. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, p. 16-23, 2014.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 495-548, 2007.

VERDOLIN, A. L. G.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, C. A.; COTA, L. V. COSTA, R. V.; SILVA, D. D.; MATTOS, B. B. Prospecção de microrganismos antagonistas para biocontrole de *Colletotrichum sublineolum*, agente causal da antracnose do sorgo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013, 28p. (Boletim técnico, 74).

VIGAL, T.; GIL, J.A.; DAZA, A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. D.; MARTÍN, J. F. Cloning, characterization and expression of an alphaamylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU3570. **Molecular & General Genetics**, v. 225, p. 278-288, 1991.

WACHINGER, G.; BRONNENMEIER, K.; STAUDENBAUER, W. L.; SCHREMPF, H. Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.10, p.2653-265, 1989.

WALCOTT, R. R.; GITAITIS, R. D.; CASTRO, A. C.; SANDERS, F. H.; DIAZ-PEREZ, J. C. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis* causal agent of center rot. **Plant Disease**, v. 86, p. 106-111, 2002.

WELLINGTON, E. M. H.; STACKEBRANDT, SANDERS, D.; WOLSTRUP, J.; JORGENSEN, N. O. G. Taxonomic status of *Kitasatospora* and proposed unification with *Streptomyces* on the basis of phenotypic and 16s rRNA analysis and emendation of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 156-160, 1992.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; WELLINGTON, E. M. H.; VICKERS, J. C.; ALDERSON, G.; SNEATH, P. H. A.; et al. A probability matrix for identification of *Streptomyces*. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 1815-1830, 1983.

WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 4^{ed}. New York: **Williams e Wilkins**, 1989, 2648p.

WILLEY, J. M.; WILLINAS, A.; KODANI, S.; NODWELL, J. R. Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 731-742, 2006.

XU, L.; LI, Q.; JIANG, C. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 244-248, 1996.

YAMAGUCHI, H.; UCHIDA, K. RI 331, a new antifungal antibiotic. **Annual of the New York Academy of Sciences**, v. 3, p. 188-190, 1988.

ZHANG, Z.; WANG, Y.; RUAN, J. A Proposal to Revive the Genus *Kitasatospora* (Ômura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n 4, p. 1048-1054, 1997.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, p. 123-137, 2009.