UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

DANIÉLLE SANTOS LIMA

**Identificação e caracterização dos metabólitos secundários
ativos secretados pela bactéria *Bacillus velezensis* que
causam inibição no crescimento de fungos filamentosos
fitopatogênicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo,
Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para
obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2018

DANIÉLLE SANTOS LIMA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS ATIVOS SECRETADOS PELA BACTÉRIA *Bacillus*
velezensis QUE CAUSAM INIBIÇÃO NO CRESCIMENTO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr.: José Ribamar dos Santos Ferreira
Júnior

Coorientador(a): Prof(a) Dr(a): Miriam Sannomiya

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se
disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca
Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2018

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica Instituto de Ciências
Biomédicas Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Santos-Lima, Daniélla

Identificação e caracterização dos metabólitos secundários
ativos secretados pela bactéria *Bacillus velezensis* que causam
inibição no crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos.
Daniélla Santos Lima; José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior;
Miriam Sannomiya. -- São Paulo, 2018.

79 p.

Dissertação (Mestrado) - - Universidade de São Paulo. Instituto
de Ciências Biomédicas.

1. *Bacillus velezensis* 2. Lipopeptídios 3. Surfactina 4.
Antifúngico 5. Iturina. Ferreira Júnior, Prof. Dr. José Ribamar
dos Santos, orientador II. Sannomiya, Miriam, co-orientadora. III
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): **Danielle Santos Lima**

Título da Dissertação: **Identificação e caracterização dos metabólitos secundários ativos secretados pela bactéria *Bacillus velezensis* que causa inibição no crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos.**

Orientador(a): Prof. Dr.: **José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a / / , considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

EACH

Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

UNIT 14

São Paulo, 20 de julho de 2016.

Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Junior – Orientador

Danielle Santos Lima – Orientanda

Projeto de Mestrado – “Isolamento, identificação, caracterização e determinação da estrutura do metabólito secundário majoritário ativo secretado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* que causa inibição no crescimento de fungos filamentosos”

Instituição – Escola de Artes, Ciências e Humanidades – EACH/USP

De acordo com a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, somente estão sujeitos à análise pelo CEUA os projetos de pesquisa ou atividade de ensino que envolvam animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata.

Dessa forma, declaro que o referido estudo não se enquadra nessas normas e, portanto, está isento de análise ou aprovação por esse CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Mario Pedrazzoli Neto

Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação EACH/USP

*Á minha mãe Ana Rita, meu pai João e meus irmãos
Audson, Uini e Rebeca. Dedico cada palavra deste
trabalho a vocês.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo folego de vida, por ser meu refúgio e fortaleza, renovar minhas forças continuamente e por ter me concedido a vitória de ter chego até aqui.

Agradeço especialmente a minha mãe Ana Rita esta mulher sábia, de fibra, por ser minha inspiração no que se tange perseverança, foco, doçura e calma diante das aflições cotidianas, por ser um porto seguro, minha amiga e companheira. Pela paciência, orações e palavras ditas que foram o meu combustível nesta empreitada. Ao meu pai João por toda a força que me deu durante este período. Aos meus irmãos Audson, Uini e Rebeca por serem quem são, e animarem meus dias.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Ribamar por todo o conhecimento passado durante estes anos durante minha iniciação científica, TCC e mestrado. Por sua paciência, seus conselhos sobre a vida, ciência e livros. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Miriam, por caminhar comigo durante o mestrado mostrando a beleza da química e por todos os conselhos dados, disponibilidade e auxílio.

Ao Prof. Dr. Pedro Dias e o Pós Doutor Marcelo Tangerina por toda paciência e dedicação, ao Prof. Dr. Wagner Vilegas por permitir que utilizássemos o seu Espectrômetro de Massas e seu Cromatógrafo Líquido.

Agradeço aos Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde, Prof. Dr. Benedito Corrêa, ao Prof. Dr. Carlos Taborda, Prof. Dr. Cleverson Busso e a Profa. Dra. Cristina Pungartnik.

Agradeço aos técnicos Rodrigo Lucena, por me auxiliar em muitos momentos no laboratório, a Sandra Pagliari pelas ajudas e ao Clarino que chegou bem no finalzinho do jogo, mas que encabeçou um belo gol de placa.

Agradeço aos colegas do Laboratório do Professor Ribamar, Rafaela, Vitória, Ana, Mônica e Fábio os quais estiveram presentes em muitos momentos importantes da minha vida científica até o momento. Em especial ao Dom Fábio, um amigo de longas datas, o qual tenho muita estima e admiração por seu trabalho e pessoa.

Também agradeço a Bia, Fran, Rodrigo, Carla, Renata, Gabriel, colegas e amigos do Laboratório da Professora Miriam, os quais chegaram no meio do jogo, mas, fizeram uma grande diferença em minha vida. Aprendi e aprendo muito com cada um de vocês.

Agradeço aos novos amigos que fiz nesta jornada Karin, Gislaine, Paulo que chegaram de mansinho e permaneceram.

E aos meus amigos Daiane, Gustavo, Felipe, Aline, Romário e novamente meu irmão Audson pelos momentos únicos e divertidos. Vocês são preciosos para mim.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia pela oportunidade dada e as secretárias Fábria e Eliane as quais serei sempre grata por todo o auxílio dado. E a CNPq pela bolsa de mestrado concedida para o processo: 134582/2016-0.

“A scientist in his laboratory is not a mere technician:
he is also a child confronting natural phenomena that
impress him as though they were fairy tales.”

Marie S. Currie

RESUMO

SANTOS-LIMA, D. Identificação e caracterização dos metabólitos secundários ativos secretados pela bactéria *Bacillus velezensis* que causam inibição no crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos. 2018. N° de folhas 79f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Alguns fungos na agricultura são classificados como fitopatógenos por causarem diversos danos a vários tipos de plantações, gerando doenças desde as raízes até os seus frutos. Uma das formas mais utilizadas para controlar tais patógenos é o emprego de defensivos agrícolas como fungicidas. Entretanto, a utilização destes compostos químicos em excesso acarreta uma série de problemas como, por exemplo, contaminações desde o solo até os lençóis freáticos, além dos problemas que podem ocasionar à saúde do ser humano, direta e indiretamente. Estudos mostram que bactérias do gênero *Bacillus* produzem metabólitos secundários, os quais apresentam atividade antifúngica, entre outras, deste modo, apresentando-se como uma potencial alternativa para substituição dos agroquímicos. O objetivo deste trabalho foi de identificar e caracterizar os metabólitos secundários secretados por um isolado da bactéria *Bacillus velezensis*, com ação antifúngica contra *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Bothrytis* sp. e *Moniliophthora perniciosa*. Realizou-se a identificação molecular da bactéria isolada com base na sequência da região 16S rDNA e fez-se uso do método de reconstrução filogenética neighbor-joining (NJ), que permitiu identificar a bactéria como *Bacillus velezensis*. Ensaios antagonísticos mostraram que a bactéria provoca inibição do crescimento dos fungos supracitados. Com intuito de determinar a estrutura do metabólito secundário responsável pela inibição do crescimento fúngico, o sobrenadante do cultivo da bactéria em caldo BD foi extraído com clorofórmio. Através da técnica de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi possível obter uma fração de metabólitos que, após análises por UPLC-MS, revelaram-se como uma mistura de compostos. A análise desta mistura por ESI-CID/MS permitiu identificar três moléculas conhecidas de surfactina que apresentam cadeias de ácido graxo diferindo entre si no número de átomos de carbono, além da descoberta da estrutura de uma nova molécula ainda não descrita na literatura. O sobrenadante do meio de cultura foi precipitado com ácido, produzindo uma mistura de metabólitos que foram fracionados usando cromatografia de permeação em gel. Este procedimento forneceu quatro grupos de frações denominados FrSph 1, FrSph 2, FrSph 3 e FrSph 4, que foram analisados por UPLC-ESI-IT-MS e experimentos de ESI-MSⁿ. Esses dados revelaram a presença concomitante de quatro moléculas de surfactina previamente relatadas com a adição de quatro metabólitos secundários da família da iturina na fração FrSph1. De outra forma, na fração FrSph 2 foram observados os mesmos compostos com predominância de três derivados de iturina e em menor teor duas surfactinas. A atividade antifúngica de todos os grupos de frações foram testadas por difusão em ágar com sete linhagens diferentes e o ensaio revelou a maior atividade observada para FrSph 1 e FrSph 2. A fração FrSph 1 mostrou atividade contra *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Bothrytis* sp. e *Moniliophthora perniciosa*, mas não contra *Aspergillus flavus*, já a fração FrSph 2 mostrou atividade contra *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Aspergillus flavus* e *Bothrytis* sp., mas não contra *M. perniciosa*. Esses resultados revelaram a importância do sinergismo entre os derivados de surfactina e iturina para a ação inibitória.

Palavra-chave: *Bacillus velezensis*. Lipopeptídios. Surfactinas. Antifúngico. Iturina.

Abstract

SANTOS-LIMA, D. Identification and characterization of active secondary metabolites secreted by the bacterium *Bacillus velezensis* that cause inhibition in the growth of phytopathogenic filamentous fungi.

2018. Number of sheets 79f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Some fungi in agriculture are classified as phytopathogens because they cause various damages to various types of plantations, generating diseases from the roots to their fruits. One of the most used ways to control such pathogens is the use of agrochemicals as fungicides. However, the use of these chemicals in excess entails a number of problems, such as contamination from soil to groundwater, as well as the problems that can directly and indirectly cause human health. Studies show that bacteria of the genus *Bacillus* produce secondary metabolites, which have antifungal activity, among others, thus presenting itself as a potential alternative for the replacement of agrochemicals. The objective of this work was to identify and characterize the secondary metabolites secreted by a *Bacillus velezensis* isolate, with antifungal action against *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Bothrytis* sp. and *Moniliophthora perniciosa*. The molecular identification of the bacterium isolated on the basis of the sequence of the 16SrDNA region was carried out and the neighbor-joining (NJ) phylogenetic reconstruction method was used to identify the bacterium as *Bacillus velezensis*. Antagonistic assays have shown that the bacterium causes inhibition of growth of the aforementioned fungi. In order to determine the structure of the secondary metabolite responsible for the inhibition of fungal growth, the culture supernatant of the bacterium in BD broth was extracted with chloroform. Using the preparative thin-layer chromatography technique (PTLC) it was possible to obtain a fraction of metabolites which, after analysis by UPLC-MS, proved to be a mixture of compounds. Analysis of this mixture by ESI-CID/MS allowed us to identify three known surfactin molecules with fatty acid chains differing in the number of carbon atoms, in addition to new molecule not yet described in the literature. The supernatant of the culture medium was precipitated with acid, producing a mixture of metabolites whose were fractionated using gel permeation chromatography. This procedure furnished four fractions groups named as FrSph 1, FrSph 2, FrSph 3 and FrSph 4, which were analyzed by UPLC-ESI-IT-MS and ESI-MSⁿ experiments. These data revealed the concomitant presence of four surfactin molecules previously related with addition of four iturin metabolites family in the FrSph1 fraction. The other side, in the fraction FrSph 2 were observed the same compounds with the predominance of three iturin derivatives and a lower content of two surfactins. The antifungal activity of all fractions groups by agar diffusion with seven different strains showed the greater activity observed for FrSph 1 and FrSph 2 fraction. The FrSph 1 fraction showed activity against *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Bothrytis* sp. and *Moniliophthora perniciosa*, but not against *Aspergillus flavus* and the FrSph 2 fraction showed activity against *Trichoderma reesei*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, and *Bothrytis* sp., but not against *Moniliophthora perniciosa*. These results revealed the importance of the synergism between surfactin and iturin derivatives to the inhibitory action.

Keywords: *Bacillus velezensis*. Lipopeptides. Surfactin. Antifungal. Iturin.

Lista de Figuras e Tabela

Figura 1: Estrutura da molécula surfactina (A), fengicina (B), iturina (C) e bacilomicina (D).....	30
Figura 2: Representação da placa de cromatografia em camada preparativa (CCP).....	39
Figura 3: Confirmação da extração do DNA genômico e amplificação do gene 16S rDNA por eletroforese.....	42
Figura 4: Árvore filogenética da bactéria <i>B. velezensis</i> (em vermelho) baseada na sequência 16S rDNA.....	43
Figura 5. Ensaio antagonístico entre <i>B. velezensis</i> e <i>T. reesei</i> QM9414.....	44
Figura 6. Ensaio de atividade antagonística entre <i>B. velezensis</i> e os fungos fitopatogênicos (A) <i>Aspergillus flavus</i> ATCC:204304, (B) <i>Botrytis</i> sp., (C) <i>M. pernicioso</i> , (D) <i>Fusarium graminearum</i> , (E) <i>F. oxysporum</i> e (F) <i>F. verticillioides</i>	45
Figura 7. Cromatograma dos extratos obtidos dos meios de cultura para crescimento e produção dos metabólitos secundários pela bactéria <i>B. velezensis</i>	46
Figura 8. Análise por CCD e revelação por luz ultravioleta nos comprimentos de ondas de 254 e 365 nm.....	46
Figura 9. Análise por CCDC da fração do extrato contendo o princípio bioativos.....	47
Figura 10. Placa cromatográfica em escala preparativa para purificação da fração orgânica bioativa.....	47
Figura 11. CCD referente ao purificado da fração orgânica de <i>B. velezensis</i>	48
Figura 12. Cromatograma obtido por UPLC-MS da fração orgânica bioativa de <i>B. velezensis</i>	48
Figura 13. Cromatograma obtido por UPLC-MS do íon de m/z1045.....	49
Figura 14. Full scan ESI-MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do meio de cultura (branco) extraído com clorofórmio.....	49
Figura 15. Full scan ESI-MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas da fração clorofórmica dos metabólitos de <i>B. velezensis</i>	50

Figura 16. Experimento MS ² realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 1059.....	51
Figura 17. Experimento MS ³ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon de m/z 946.....	51
Figura 18. Experimento MS ⁴ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon de m/z 833.....	52
Figura 19. Experimento MS ⁵ realizado por ESI-CID/MS ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 717 gerando o pico 618.....	52
Figura 20. Experimento MS ³ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon 708 gerando o íon de m/z 595.....	53
Figura 21. Experimento MS ⁴ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de m/z 595 gerando o pico 481.....	53
Figura 22. Experimento MS ⁵ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo do espectro (35 eV) de massas do íon produto de m/z 481 gerando o íon produto de m/z 464.....	54
Figura 23. Full MS ² ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de m/z 1031.....	55
Figura 24. Experimento MS ³ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de m/z 918 gerando o íon produto de m/z 805 (787) a partir do íon m/z 787 a geração do íon de m/z 689.....	55
Figura 25. Experimento MS ³ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de m/z 689 (672) gerando o íon produto de m/z 590.....	56
Figura 26. Full MS ² ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 1045.....	56
Figura 27. Experimento MS ³ realizado por ESI-CID/MS ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 932 o qual gerou o íon produto de m/z 818.....	57

Figura 28. Experimento MS ⁴ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon <i>m/z</i> 819. De acordo com a fragmentação obteve-se o íon produto de <i>m/z</i> 703.....	57
Figura 29. Experimento MS ⁵ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon <i>m/z</i> 703. De acordo com a fragmentação obteve-se o íon produto de <i>m/z</i> 605.....	58
Figura 30. Experimento MS ³ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon <i>m/z</i> 1045. De acordo com a fragmentação por CID obteve-se o seguinte íon produto de <i>m/z</i> 693.....	58
Figura 31. Experimento MS ⁴ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon <i>m/z</i> 693. De acordo com a fragmentação por CID obteve-se o seguinte íon produto de <i>m/z</i> 594.....	59
Figura 32. Experimento MS ⁵ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon <i>m/z</i> 594. De acordo com a fragmentação obteve-se íon produto de <i>m/z</i> 481 e 463.....	59
Figura 33. Full MS ² ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (32 eV) do espectro de massas do íon <i>m/z</i> 1045. Nova estrutura. Em azul fragmentação da primeira via do anel lactona e em rosa a segunda via de fragmentação.....	63
Figura 34. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph1 do precipitado de <i>B. velezensis</i>	62
Figura 35. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph2 do precipitado de <i>B. velezensis</i>	62
Figura 36. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph3 do precipitado de <i>B. velezensis</i>	63
Figura 37. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph 4 do precipitado de <i>B. velezensis</i>	63
Figura 38. Ensaio de difusão em disco com as frações (1) -FrSph1, 2- (FrSph2), 3- (FrSph3), 4- (FrSph4) e C – (Controle DMSO) contra os fungos fitopatogênicos (A) <i>Aspergillus flavus</i> , (B) <i>Botrytis</i> sp., (C) <i>M. perniciosa</i> , (D) <i>Fusarium graminearum</i> , (E) <i>F. oxysporum</i> , (F) <i>F. verticillioides</i> e (G) <i>T. reesei</i> QM9414.....	64
Tabela 1: Reagentes para produção de 1 L dos meios de cultura usados neste trabalho.....	33
Tabela 2: Estruturas dos lipopeptídios cíclicos obtidos por ESI-CID/MS.....	61

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABCBio - Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico

ADAPAR - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná

Asp – Aspartato

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CID - Collision Induced Dissociation

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CTAB - Cetrimonium Bromide

Da - Dalton

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI-MS - Electrospray Ionization Mass Spectrometry

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA – Food and Drug Administration

GATe - Laboratório de Genômica e Elementos Transponíveis

Glu - Glutamato

H₂O - Água

UPLC-MS – Ultra-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

Ile – Isoleucina

IT – Ion Trap

K2P – Kimura's Two Parameter

Leu - Leucina

m/z- massa/carga

MS - Mass Spectrometry

MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis

OD₆₀₀ - Optical Density (Densidade Óptica) a um comprimento de onda de 600nm

ONU - Organizações das Nações Unidas

PCR - Polymerase Chain Reaction

Rf - Fator de Retenção

SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - Ministério da Saúde/FIOCRUZ

Val – Valina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. UTILIZAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS.....	19
2.2. FUNGOS E SUAS AÇÕES	20
2.2.1. <i>Fungos Fitopatogênicos</i>	<i>21</i>
2.3. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	22
2.3.1. <i>Controle Biológico</i>	<i>23</i>
2.3.1.1. DEFINIÇÃO	23
2.3.1.2. CONTROLE BIOLÓGICO BREVE HISTÓRIA.....	23
2.3.1.2.1 DATAS HISTÓRICAS DO CONTROLE BIOLÓGICO NO BRASIL	24
2.3.1.3. AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO E SUAS INTERAÇÕES	25
2.4. COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS	26
2.4.1. <i>Metabolismo Secundário</i>	<i>27</i>
2.4.1.1. <i>Metabólitos Secundários Bacterianos.....</i>	<i>28</i>
2.5. <i>BACILLUS VELEZENSIS</i>	30
3. OBJETIVO	31
3.1. OBJETIVO GERAL.....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. MICRO-ORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA.....	32
4.1.1. <i>Micro-organismos</i>	<i>32</i>
4.1.2. <i>Meios de Cultura</i>	<i>32</i>
4.2. ENSAIOS ANTAGONÍSTICOS <i>IN VITRO</i>.....	33
4.2.1 <i>Ensaio Antagonísticos entre B. velezensis e o fungo Trichoderma reesei</i>	<i>33</i>
4.2.3. <i>Ensaio Antagonísticos entre B. velezensis e os fungos fitopatogênicos.....</i>	<i>34</i>
4.3. OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>B. VELEZENSIS</i>.....	34
4.3.1. <i>Meio de cultura para produção de metabólitos secundários.....</i>	<i>34</i>
4.3.1.1. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS.....	35
4.3.1.2. TRIAGENS CROMATOGRÁFICAS.....	35
4.3.2. <i>Produção dos metabólitos secundários por B. velezensis</i>	<i>35</i>
4.4. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	35

4.4.1. Extração do DNA	35
4.4.1.1. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	36
4.4.2. PCR e Purificação	37
4.4.3. Sequenciamento do DNA	37
4.4.4. Qualidade das Sequências, Alinhamento Múltiplo e Análise Filogenética	38
4.5. ANÁLISES QUÍMICAS	38
4.5.1. Obtenção da Fração Orgânica	38
4.5.2. Triagens Cromatográficas	38
4.5.3. Purificação da Mistura de Metabólitos Antifúngicos	39
4.5.4. ESI-MS ⁿ análise	39
4.6. ANÁLISES E FRACIONAMENTO POR PERMEACÃO EM GEL	40
4.6.1. Precipitação Ácida	40
4.6.2. Fracionamento dos Metabólitos Oriundos do Precipitado	40
4.7. UPLC-ESI-IT-MS ANÁLISE	41
4.8. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA COM OS GRUPOS DE FRAÇÕES	41
5. RESULTADOS	42
5.1. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	42
5.1.1 Extração do DNA Genômico, PCR e Purificação	42
5.1.2. Árvore Filogenética e Identificação Molecular	42
5.2. TESTE ANTAGONÍSTICO	43
5.2.1. Efeito antagonístico de <i>B. velezensis</i> contra <i>Trichoderma reesei</i> QM9414	43
5.2.3. Efeito antagonístico de <i>B. velezensis</i> contra fungos filamentosos fitopatogênicos	44
5.3. ANÁLISES QUÍMICAS	45
5.3.1. Seleção do meio de cultura para Produção de Metabólitos Secundários pela bactéria	45
5.3.2. Obtenção da fração antifúngica	46
5.3.3. Purificação dos compostos presentes na fração orgânica bioativa (FrOrg)	47
5.4. ANÁLISE POR UPLC-MS E ESI-CID/MS^N	48
5.4.1. Perfil cromatográfico por UPLC-MS da FrOrg	48
5.4.2. FULL SCAN ESI-CID/MS DA FRORG	49
5.4.2.1. Íon [M+Na] ⁺ <i>m/z</i> 1059	50
5.4.2.2. Íon [M+Na] ⁺ <i>m/z</i> 1031	54
5.4.2.3. Íon [M+Na] ⁺ <i>m/z</i> 1045	56
5.4.2.4. Isômero íon <i>m/z</i> 1045	59
5.5. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DAS FRAÇÕES	61

5.5.1. Fração Sephadex 1	61
5.5.2. Fração Sephadex 2	62
<u>5.5.3. Fração Sephadex 3.....</u>	62
5.5.4. Fração Sephadex 4	63
5.6. ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR COM OS GRUPOS DE FRAÇÕES	64
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	72
APÊNDICE 1.....	83

1. INTRODUÇÃO

O setor do agronegócio é um dos mais representativos no Brasil e contribui com, aproximadamente, 24% do PIB (Produto Interno Bruto) (BARROS, 2018). Segundo as projeções para o agronegócio feita pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para 2016/2017, o Brasil está entre os maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos como a soja, o milho, o açúcar, o trigo entre outros. Contudo, para que continue se mantendo nesta posição, a forma com que os agricultores tratam as lavouras é muito importante, pois, um dos maiores problemas que agravam a produção de alimentos causando imensas perdas são a presença de patógenos. Segundo SUPRAPTA (2012) as plantações estão expostas a cerca de 70.000 espécies de patógenos o que diminui em 40% a produção dos alimentos. Dentre os vários tipos de patógenos que atacam as plantas temos os fungos. Estes micro-organismos quando geram algum tipo de doença nas plantas são denominados como fungos fitopatogênicos. A ação destes fungos, podem promover várias complicações no desenvolvimento das lavouras gerando danos às folhas, frutos, sementes, caules, raízes e ao sistema vascular da planta além do apodrecimento, portanto, diminuindo a qualidade dos produtos (SILVA, 2013), além de causarem doenças nos animais e seres humanos. Em função desta problemática, os fungos tornaram-se objetos de muitos estudos na procura de métodos para um seu controle.

Na agricultura, embora sejam bons os resultados que a utilização dos agroquímicos (pesticidas, agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, entre outros) trazem no cuidado com as lavouras, há uma preocupação que se levantou nos últimos anos sobre a utilização dos mesmos, levando à produção de alimentos sem a utilização deles ou que seu uso adequado fosse comprovado (MORANDI & BETTIOL, 2009).

Alguns dos defensivos agrícolas mais empregados são os fungicidas os quais apresentam uma classificação de acordo com a sua composição química e sua forma de ação contra os fitopatogênicos (ZAMBOLIM et al., 1995; KIMATI, 1995). Os fungicidas mais utilizados para controle dos efeitos dos fungos sobre a agricultura são: ABACUS HC utilizado em lavoura de algodão, milho, soja e outros; BIM 750 usado em lavouras de arroz, arroz irrigado e tratamento de sementes; CARBOMAX 500 SC usado em lavouras de feijão, soja e citros; SIMBOL 125 SC usado em lavouras de trigo, aveia e café; Cobre ATAR BR utilizado nas plantações de abacate, amendoim, citros, goiaba e cacau, entre outros (ADAPAR - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná).

Entretanto, embora apresente resultados satisfatórios no controle dos patógenos os defensivos agrícolas como os fungicidas entre outros têm gerado graves problemas. Entre 1999 e 2009 a SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - Ministério da Saúde/FIOCRUZ) notificou que cerca de 60 mil pessoas sofreram intoxicações agudas (BOMDARDI, 2011) causadas por compostos utilizados no combate de pragas da agricultura. Embora alguns outros métodos para reduzir os efeitos dos fitopatogênicos nas lavouras sejam empregados, tais como a não utilização de defensivos agrícolas

ou o seu uso de forma controlada, é de grande relevância encontrar uma forma de controle para os fungos a qual a utilização destes tipos de produtos agrícolas seja descartada. Deste modo, colaborando para que os prejuízos ao meio ambiente e ao ser humano sejam minimizados. Assim, em estudos realizados com esse propósito, descobriram-se que determinadas bactérias secretam compostos, denominados metabólitos secundários, os quais podem influenciar no desenvolvimento de alguns tipos de fungos, nematoides e até mesmo de outras bactérias, demonstrando-se um bom potencial biotecnológico como controle biológico, além de não causar prejuízo aos seres humanos (BENITEZ et al., 2012). Desta maneira, o estudo referente à identificação e caracterização de moléculas do metabolismo secundário de bactérias, que apresentam atividade contra patógenos de plantas é extremamente importante, dado que tais moléculas podem substituir os fungicidas empregados na agricultura, agindo como um controle biológico com a mesma potencialidade ou até maior, porém não causando danos ao meio ambiente e a ser humano.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Utilização de Defensivos Agrícolas

O rápido desenvolvimento na produção de alimentos no Brasil releva um possível aumento para os próximos anos, desta maneira, influenciando significativamente na economia nacional (SILVA, 2013). Todavia, a forma de produção destes alimentos tem gerado problemas. Em particular, dependendo do modo como é feito o controle referente às pragas e doenças que afetam a lavoura, pode-se obter desde bons resultados até àquelas condições que podem ser prejudiciais à qualidade do alimento.

O Brasil encontra-se entre os maiores consumidores de defensivos agrícolas no mundo segundo o relatório apresentado pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) de 2015, revelando assim que o consumo de fertilizantes e produtos químicos agrícolas no Brasil tem se intensificado. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2009 o país consumiu cerca de 1 milhão de toneladas de defensivos agrícolas o que corresponde a cerca de 5,2 Kg deste tipo de produto por pessoa no país. Entre os anos de 2001 e 2008 o Brasil vendeu cerca de R\$ 7 bilhões de reais em defensivos agrícolas e no ano de 2011 alcançou a marca de R\$ 8,5 bilhões de reais em vendas (SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal).

O relatório de 2017 apresentado pela ONU (Organização das Nações Unidas) para os Direitos Humanos que teve como pauta a questão alimentar, suscitando a problemática da utilização excessiva de pesticidas e outros produtos químicos no tratamento das lavouras, onde menciona-se os prejuízos à saúde causado tanto pelo contato direto com os defensivos agrícolas quanto o contato indireto pela ingestão destes produtos através dos alimentos, por se acumularem e permanecerem no organismo.

Segundo a SINITOX, entre 2010 e 2011, o número de mortes por contato direto (intoxicação) com os defensivos agrícolas chegou a 1.500 casos; já em 2012, notificou-se que cerca de 34% das mortes por intoxicações humanas por agentes tóxicos foram causadas por defensivos agrícolas e no ano de 2016 o número de mortes pela mesma causa subiu 6% totalizando 40%.

O uso exacerbado de defensivos agrícolas para controle das pragas e doenças em lavouras também tem acarretado uma série de problemas ambientais e sociais como a contaminação de lençóis freáticos, bacias hidrográficas, e do próprio solo, além da extinção de micro-organismos importantes para a ciclagem dos nutrientes no solo e da seleção de cepas que apresentam resistência aos defensivos agrícolas utilizados (SILVA, 2013).

O emprego dos defensivos agrícolas tem despertado na sociedade uma preocupação que levou o mercado agrícola a repensar suas formas e estratégias de cultivo. Essa nova conduta poderá incluir a extinção do uso dos defensivos agrícolas ou o estabelecimento de um controle mais rigoroso da utilização destes compostos (MORANDI & BETTIOL, 2009).

2.2. Fungos e suas ações

Os fungos são bastante utilizados em alguns setores como na área farmacêutica, da alimentação entre outras. Os cogumelos são um exemplo de fungos amplamente empregados na alimentação humana. Há fungos que são empregados nos processos de produção de alguns alimentos como, por exemplo, leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que são utilizadas na fermentação de pães, produção de vinhos, rum, uísques (PELCZAR Jr. *et al.* 1996) e cervejas. Estas leveduras são usadas também em outros processos industriais como o processo de fermentação para produção de biocombustível, convertendo o açúcar obtido da cana-de-açúcar em etanol (RAW *et al.* 2001). Na área farmacêutica, destaca-se o fungo *Penicillium chrysogenum* ou *P. notatum*, o qual trata-se de um bolor produtor do β -lactâmico penicilina (TRABULSI & ALTHERTUM, 2008). Ainda neste mesmo âmbito, tem o gênero do fungo antigamente conhecido como *Cephalosporium* e atualmente reconhecido como *Acremonium*, o qual é responsável pela produção do antibiótico cefalosporina (TRABULSI & ALTHERTUM, 2008). Apesar dos inúmeros benefícios inerentes a estes micro-organismos, existem, em contrapartida, alguns fungos que podem acarretar danos ao homem, animais e à agricultura (WONG *et al.*, 2008). Ao homem e animais, por exemplo, temos as espécies de fungos dimórficos como *Histoplasma capsulatum* que causam micoses sistêmicas como a histoplasmose, uma doença que afeta os pulmões e o sistema reticuloenotelial que atinge humanos e animais (GÓMEZ, 2011). O fungo geofílico dimórfico *Sporothrix schenckii*, responsável pela micose subcutânea denominada esporotricose, a qual ataca os animais e o homem (SILVA *et al.*, 2012). Algumas espécies do gênero *Aspergillus*, em especial a espécie *A. fumigatus*, podem causar a infecção no trato respiratório denominada aspergilose, a qual refere-se a uma

doença oportunista que ataca principalmente os pulmões, entre outros tipos de fungos (BEISSWENGER et al, 2012). Já na agricultura os fungos são classificados como fitopatógenos por causarem diversos prejuízos a vários tipos de cultura de lavouras gerando doenças desde as raízes até os seus frutos (DIAS, 2011).

2.2.1. Fungos Fitopatogênicos

O termo fitopatologia origina-se de três palavras gregas (phyton = planta; pathos = doença; logos = estudo), tratando-se portanto, do estudo de doenças em plantas. Dentre os agentes causais das patogênias em plantas os fungos são um dos agentes mais importantes (CAROLLO & FILHO, 2016).

A maioria das doenças em plantas advém da interação entre a planta (hospedeiro) e o fungo (parasita). Segundo KNOGGE (1996) cerca de 10% de todos os fungos conhecidos podem colonizar plantas, no entanto, os fungos fitopatogênicos representam uma porção muito pequena frente a grande reino Fungi (KNOGGE, 1996). A maioria dos fungos são decompositores, utilizando os restos de plantas e outros organismos como fonte de alimento. Os fungos fitopatogênicos desempenham o papel dominante não apenas por causar epidemias devastadoras, mas também pelas perdas de rendimento anuais. Por serem persistentes e significativos, os fungos fitopatogênicos são reconhecidos como sendo um sério fator econômico, atraindo assim, a atenção de agricultores, criadores de plantas e cientistas (KNOGGE, 1996).

Uma grande parte dos fungos fitopatogênicos apresentam um ciclo de vida no qual vivem durante um período em uma planta hospedeira e, em outro no solo ou mesmo em restos vegetais. Algumas espécies apresentam todo o seu ciclo de vida em uma planta hospedeira e apenas seus esporos são depositados no solo até o momento que sejam levados (pelo vento, água etc.) a um hospedeiro, para que ocorra a germinação e reprodução, enquanto outras espécies vivem parte de seu ciclo de vida como parasita de plantas e outra parte de seu ciclo como saprófitas de solo (CAROLLO & FILHO, 2016).

Dentre os fitopatógenos que prejudicam as lavouras encontram-se os fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Moniliophthora* e *Aspergillus* (DIAS, 2011) entre outros. Estes patógenos são amplamente estudados devido aos prejuízos que causam às folhas, frutos, sementes, caules, raízes, ao sistema vascular da planta, assim como o apodrecimento do colo de plantas adultas ocasionando a morte das mesmas (DIAS, 2011).

Espécies do gênero *Fusarium* desenvolvem-se no solo e apresentam alta patogenicidade em plantas, por causar murcha, amarelecimento e podridão das sementes (NUNES, 2003). Como exemplo, as espécies de fungos *Fusarium graminearum* e *F. verticillioides* afetam vários tipos de cereais como trigo, milho, aveia, feijão, soja, cevada entre outros, além de produzirem a micotoxina fumonisina. Por intermédio de seus ascósporos contaminam as flores prejudicando seu desenvolvimento e assim comprometem a formação dos grãos, além de também contaminarem diretamente os grãos e outras

partes da plântula causando grandes perdas na produção e qualidade fisiológica destes tipos de grãos (CAXIETA, 2012; RAMOS et al., 2014). A espécie *F. oxysporum* causa podridão radicular, podridão do bulbo, *damping-off* e murcha vascular em culturas de plantas como tomate, palmito, banana, algodão entre outros (DEAN, et al., 2014). Algumas espécies deste gênero com o *F. graminearum* e o *F. oxysporum* estão no ranking das 10 espécies de fitopatógenos de importância científica e econômica (DEAN, et al., 2012).

Botrytis spp. prejudicam as fases de desenvolvimento da planta e promovem uma série de patogenias como o apodrecimento dos frutos, podridão do bulbo da planta, secura e queda das folhas (DIAS, 2011). Como exemplo a espécie *B. cinerea*, conhecida como “mofo cinzento”, contamina plantas como batata, morango, uvas, limão, framboesa, grão de bico entre outras, causando infecções que aparecem no período de amadurecimento do fruto e na pós-colheita, afetando a produção e causando consideráveis perdas (FILIPPI, 2018; GRABKE, 2014). Esta espécie também está no ranking das 10 espécies de patógenos de importância científica e econômica descrita por DEAN e colaboradores (2012).

Espécies do gênero *Aspergillus* por sua vez, causam podridão do fruto (LIMA, 2002). Como exemplo, a espécie *A. flavus*, produtora da micotoxina aflatoxina, é encontrada contaminando principalmente amendoim. Sua presença se dá no momento do armazenamento dos grãos causando danos como deterioração das sementes, alteração nutricional, danos no embrião, descoloração entre outros (CAXIETA, 2012).

O fungo *Moniliophthora perniciosa* ataca tanto os ramos jovens como flores e frutos. A forma como ataca a planta é dividida em dois estágios. No primeiro estágio do desenvolvimento do fungo na planta, sua ação agride os tecidos meristemáticos da planta levando à perda da dominância apical, ocasionando a superbrotção denominada vassoura verde, além de gerar deformidades nos frutos e flores. No segundo estágio de desenvolvimento promove a necrose, apodrecimento e morte das regiões atingidas pelos micélios do fungo (DARWICHE, et al., 2017; FORMIGHIERI, 2006).

Uma das maneiras mais empregadas para minimizar a ação destes fungos nas lavouras é a utilização dos fungicidas. A utilização destas substâncias demonstra-se, em determinado ponto, importante para conter as pragas além de contribuir para o aumento e geração de produtos comerciais de qualidade, tornando-se um item de suma importância no momento do planejamento do plantio; entretanto, estes produtos também podem ocasionar problemas graves (DIAS, 2011).

2.3. Estratégias de Controle contra Fungos Fitopatogênicos

Existem várias estratégias para o controle dos fungos fitopatogênicos sendo utilizadas para evitar ou diminuir a utilização de defensivos agrícolas como os fungicidas através de técnicas como a

rotação de cultura, a qual consiste na alternância anual das espécies vegetais em uma mesma área (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2004); introdução de material orgânico no solo (REIS e FORCELINI, 1995; AMBRÓSIO et al., 2008); termoterapia (SINCLAIR, 2003), na qual as sementes são tratadas com calor úmido (vapor, água quente) ou calor seco, em temperaturas que variam de 50 a 85 ° C, por 11 dias (SILVA et al., 2002), e após são semeadas. Contudo, nem sempre essas estratégias são eficazes no controle de tais patógenos, levando os agricultores a empregar como meio de controle de pragas e doenças os defensivos químicos, os quais acabam se tornando indispensáveis para obtenção de uma maior produtividade e qualidade do produto proveniente do agronegócio (KIMATI, 1995). Todavia, uma estratégia recente que tem colaborado para a diminuição e até substituição ao uso dos defensivos agrícolas é o Controle Biológico realizado por intermédio de micro-organismos. Este tipo de método tem sido bastante estudado e tem apresentado resultados satisfatórios (MORANDI & BETTIOL, 2009).

2.3.1. Controle Biológico

2.3.1.1. Definição

O controle biológico trata-se do uso de populações de parasitoides, predadores, patógenos, antagonistas ou competidores para suprimir uma população de pragas, tornando-as menos abundantes e, por consequência, menos prejudiciais (Van DRIESCHE & BELLOWS 1996). Este termo foi utilizado inicialmente pelo pesquisador Harry S. Smith (1919) para representar o uso de inimigos naturais (introduzidos ou manipulados) para controlar pragas de insetos.

Segundo WILSON & HUFFAKER (1976), vários pesquisadores ao longo dos anos, em destaque os entomologistas, têm definido este tipo de controle. DEBACH (1964) define controle biológico sendo a ação de parasitas, predadores e patógenos que mantém a densidade populacional de outros organismos em uma média mais baixa do que ocorreria em sua ausência. Já Van den BOSH *et al.* (1982) estabelece que controle biológico se trata da regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais ou, simplesmente, o restabelecimento do balanço da natureza. E CALTAGIRONE (1988) considera que o controle biológico é a regulação de populações de organismos vivos resultantes de interações antagonísticas como parasitismo, predação e competição.

2.3.1.2. Controle Biológico Breve História

A história do controle biológico inicia-se com a utilização de formigas (*Oecophylla smaragdina*) como instrumentos de controle pelos chineses com o objetivo de controlar lepidópteros e coleobrocas de citrus no século III a.C. (Van den BOSH et al., 1982). Em 2.200 a.C. os egípcios já se referiam a doenças em abelhas, assim como gregos e chineses mais tardiamente referiram-se as doenças que ocorriam com o bicho da seda e abelhas (GONÇALVES, 1996). No século XVIII várias tentativas para controle biológico foram feitas, no entanto, o sucesso com estas tentativas vieram apenas no século

XIX, com a introdução da "joaninha" (*Rodolia cardinalis*) importada da Austrália para Califórnia para controlar o "pulgão branco" (*Icerya purchasi*). Os resultados satisfatórios deste método foram observados após dois anos da liberação da "joaninha". Este tipo de controle foi um marco no controle biológico por sua efetividade como controle de pragas (GALLO et al., 1978; GRAVENA, 1992; PARRA et al.2002). No ano de 1830 micro-organismos como fungos e a posteriore as bactérias e protozoários, foram classificados como agentes (pragas) causadores de doenças em insetos. Em 1870, com este conhecimento, realizaram a primeira tentativa de utilizar tais agentes para controle de insetos (GALLO et al., 1978).

Em diferentes países entre os anos de 1890 e 1975 mais de 150 programas de controle biológico apresentaram resultados satisfatórios (STEHR, 1975; Van den BOSH et al., 1982). Neste ínterim, na Alemanha, foi descoberta a espécie bacteriana pertencente ao gênero *Bacillus* denominada *Bacillus thuringiensis* isolada a partir da traça de farinha (*Anagasta kuehniella*) por Ernst Berliner, a qual começou a ser utilizada como inseticida e comercializada como produto na França em 1938 e nos Estados Unidos por volta de 1950 (BRAR et al., 2006; CAPALBO et al., 2004)

Somente no fim do século XIX que o controle biológico foi visto como método científico, pois somente ao final deste século que os conceitos referentes aos processos evolutivos, a questão da luta pela sobrevivência, pressão populacional surgiram para que, assim, desse orientação para o conceito de controle biológico (HUFFAKER & MESSENGER, 1976).

2.3.1.2.1 Datas Históricas do Controle Biológico no Brasil

O controle biológico é bastante recente no Brasil. Seu início data da década de 50 com a primeira publicação feita pelo Dr. Reinaldo Foster pesquisador do Instituto de Agronomia de Campinas. Seu trabalho tratou da paralisação do vírus mosaico por intermédio do filtrado de *Trichoderma sp.* No ano de 1960 Pigatti e colaboradores realizaram a aplicação de *B. thuringiensis* para controlar lagarta de mandioca (MORANDI & BETTIOL, 2009). Em 1966 utilizam o fungo *Metarhizium anisopliae* como controle de "cigarrinha" das folhas no nordeste do país (GONÇALVES, 1996). Na década de 70 criou-se no curso de Pós-Graduação de Entomologia na ESALQ-USP, uma disciplina voltada para a patologia de insetos dando o início nesta área no país (GONÇALVES, 1996). Nesta mesma década o Instituto Biológico do Estado de São Paulo, inicia a multiplicação e repasse do parasitoide *Neodusmetia sangwani* para controle de conchonilha (*Antonina graminus*), o qual havia sido trazido para o Brasil na década de 60 (FILHO & SILVA, 1988).

Entre os anos de 1986 e 1987 aconteceram as primeiras Reuniões Brasileiras em Piracicaba - São Paulo, sobre o Controle Biológico de Doenças de Plantas, desta forma assinalando a formação desta área no Brasil. Também no ano de 1987 liberou-se o primeiro biocontrole oriundo de *Trichoderma viride*. Tal fungo produz metabólitos secundários que causam inibição no crescimento de outros fungos

filamentosos (DIKSHIT et al. 2011). O biocontrole foi fornecido comercialmente pelo Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado da EMBRAPA (MORANDI & BETTIOL, 2009).

De acordo com MORANDI & BETTIOL (2009) na década de 90, muitos fatos referentes a evolução e estabelecimento do Controle Biológico ocorreram, como exemplo, a aplicação do fungo do gênero *Acremonium* para controle da lixa pela empresa Maguari S.A., em 1990 (MORANDI & BETTIOL, 2009). No ano seguinte houve a publicação do livro intitulado “Controle Biológico de Doenças de Plantas”, o qual foi o primeiro nesta temática publicado pela EMBRAPA. Em 1992 aconteceu a primeira realização de apresentações específicas para o tema no XXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia ocorrido em Gramado, além da primeira empresa especializada na produção e comercialização de *Trichoderma sp.* para controle biológico denominada BIOAGRO ALAM Ltda (MORANDI & BETTIOL, 2009). Em novembro de 1997 foi publicada pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) a portaria 131 que estabeleceu critérios e procedimentos para registros e avaliação ambiental de agentes microbianos empregados na defesa fitossanitária (MORANDI & BETTIOL, 2009).

A partir dos anos 2000 se deu o desenvolvimento de vários novos produtos entre eles o fungicida Tricovab® e o Trichodermi® oriundos de *Trichoderma spp.* e a criação da Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico – ABCBio voltados para esta temática com a finalidade de unir as empresas produtoras de produtos biológicos para controle de pragas, assim como, os comerciantes destes tipo de produtos com o intuito de regulamentar, fortalecer e representar este tipo de produto no mercado (MORANDI & BETTIOL, 2009). Desde então, não somente fungos do gênero *Trichoderma* têm sido estudados e utilizados como controle biológico, mas outros organismos também têm apresentado potencialidades para este tipo de aplicação devido aos compostos produzidos por estes micro-organismos.

2.3.1.3. Agentes de Controle Biológico e suas Interações

Os inimigos naturais que atuam como agentes de controle biológico são divididos em dois grupos. O primeiro como os agentes entomófagos e o segundo como os agentes entomopatogênicos. Faz parte do primeiro grupo os predadores e parasitóides, já do segundo grupo os patógenos. Os agentes entomófagos são aqueles insetos que se alimentam de outros insetos. Os inimigos naturais pertencentes a este grupo devem apresentar como particularidade: ser um predador ou parasita de um hospedeiro ou presa específico; flexibilidade as mudanças do meio ambiente; capacidade de multiplicar-se frente ao seu hospedeiro ou presa; apresentar sincronização sazonal com seu hospedeiro ou presa; resistência nos períodos de ausência de seu hospedeiro ou presa entre outros. Os agentes entomopatogênicos são micro-organismos (patógenos) que são utilizados como controle de insetos (hospedeiros) (FILHO & CIOCIOLA, 2002), a bactéria *Bacillus thuringiensis* é um exemplo a este tipo de interação.

Uma outra forma de interação entre agentes biológicos e as pragas é a competição. A competição trata-se da interação entre indivíduos da mesma espécie ou entre indivíduos de espécies diferentes que dependem de um determinado recurso (alimento, território) em comum, sendo este recurso encontrado em quantidades limitadas, ou seja, a competição é uma relação desarmônica na qual uma espécie afeta outra de forma a impedir que ela chegue ao recurso. A competição é dividida em competição interespecífica, quando acontece entre indivíduos de espécies diferentes e intraespecífica quando acontece entre indivíduos da mesma espécie (CONNELL, J. H. 1983; RAVEN et al, 1996).

Competição interespecífica é subdividida em relações sendo a primeira relação interespecífica denominada relação harmônica. Esta refere-se a relações onde as duas espécies são beneficiadas como, por exemplo, na protocooperação onde as espécies se beneficiam uma com a presença da outra, contudo, não são dependentes uma da outra; mutualismo que consiste na relação das duas espécies de tal forma que elas não conseguem viver uma sem a outra; o inquilinismo trata-se de uma relação onde uma determinada espécie (inquilina) obtém vantagens a partir de outra espécie (hospedeiro) para sua proteção, transporte ou até mesmo suporte de maneira que não cause prejuízos a nenhuma das espécies envolvidas e o comensalismo é a relação entre espécies que uma beneficia-se com os restos alimentares da outra (CONNELL, 1983; TOWNSEND et al., 2008).

A relação interespecífica secundária é denominada como relação desarmônica esta ocorre quando duas espécies distintas convivem em uma mesma comunidade, todavia, competem pelos recursos como, por exemplo, o parasitismo, este consiste em uma relação onde o parasita associa-se a um hospedeiro de forma a prejudicá-lo, pois, retira de seu hospedeiro recursos para sua sobrevivência; também há o predatismo que consiste em uma relação cuja uma espécie caça, mata e alimenta-se de outra espécie; a herbivoria assemelha-se ao predatismo, contudo, nesta a espécie herbívora extrai recursos de partes vivas de uma planta e por fim o amensalismo ou antagonismo é uma relação na qual uma espécie prejudica o desenvolvimento de uma espécie secundária com o propósito de adquirir benefícios em relação aos recursos disponíveis. Este prejuízo é causado ou por inibição no crescimento da espécie competidora ou sua reprodução (MORANDI et al., 2009; TOWNSEND et al., 2008).

2.4. Compostos Antifúngicos

Vários compostos apresentam potencialidades na inibição de micro-organismos, desde lipopeptídios não ribossomais até algumas proteínas, as quais são produzidas por uma grande variedade de organismos como as bactérias, o ser humano, outras espécies de vertebrados, invertebrados, plantas e fungos (WONG et al. 2008; WILLIAM et. al. 1989)

Existe uma gama de proteínas antifúngicas que foram estudadas como, por exemplo, as glucanases, um tipo de proteína antifúngica obtida de planta (VIGERS et al. 1991). Esta proteína foi

encontrada na espécie *Jatropha curcas*, a qual é oriunda de regiões de climas extremos (WEI *et al.* 2005); outra proteína é a proteína análoga a proteína taumatina, a qual apresenta a sequência de aminoácidos altamente similar à da proteína taumatina obtida da planta *Thaumatococcus daniellii*, encontrada no oeste da África. No entanto, a proteína análoga à proteína taumatina, embora seja bastante semelhante estruturalmente, não é doce ao paladar, todavia apresenta atividade inibitória contra fungos, diferentemente da proteína taumatina obtida de *T. daniellii*, a qual é doce ao paladar, e não apresenta nenhuma atividade inibitória (Ho *et al.* 2007). Estas proteínas análogas a taumatina são produzidas por algumas monocotiledôneas como cevada, trigo, sorgo e aveia, e tem capacidade de inibir o crescimento micelial dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola* (Ho *et al.* 2007; WONG *et al.* 2008).

Também existe alguns antifúngicos de origem semi-sintética, os quais são oriundos da fermentação de vários fungos como, por exemplo, *Coleophoma empedri*, *Aspergillus nidulans* e *Glarea lozoyensis*. Os produtos produzidos por estes fungos são denominados equinocandinas. No entanto, inicialmente foi nomeada como pneumocandinas por apresentar atividade *in vitro* contra espécie *Pneumocystis jiroveci* e espécies de *Candida* (CORTÉS & RUSSI, 2011; MORRIS & VILLIMANN, 2006). As equinocandinas fazem parte da classe de medicamentos antifúngicos que são amplamente utilizados para tratamento de micoses humanas. São hexapeptídeos cíclicos compostos com grupos linoleoil que acila o terminal N do peptídeo cíclico, e o grupo amino que conecta a 3-hidroxi-4-metilprolina ao grupo δ -amino do di-idroxioritina a forma de anel (MORRIS & VILLIMANN, 2006). As equinocandinas são compostas pelas seguintes moléculas: anidulafungina, primeira molécula a ser isolada desta classe e terceira a ser liberada pela FDA – Food and Drug Administration para uso em humanos; caspofungina, primeira molécula da classe a ser liberada para uso em humano e a micafungina segunda a ser liberada para uso em humano (CORTÉS & RUSSI, 2011).

Estudos focados na produção de metabólitos secundários ativos têm sido realizados. A literatura mostra que alguns tipos de metabólitos secundários apresentam potencialidades no controle de vários micro-organismos, incluindo fungos fitopatogênicos (WONG *et al.* 2008). Como exemplo o fungicida Tricovab® o qual é oriundo de *Trichoderma stromaticum*, pouco tóxico e que já é utilizado para controle de vassoura de bruxa Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC.

2.4.1. Metabolismo Secundário

O metabolismo primário pode ser definido como o conjunto de processos e reações químicas presente em todos os organismos existentes, os quais geram energia essencial para o desenvolvimento (PETRY, 2015; VINING, 1986). Já o metabolismo secundário depende dos produtos advindos do metabolismo primário para geração de seus produtos e não apresenta um papel de importância direta no desenvolvimento dos organismos. Esta via metabólica permite a produção de compostos ativos ou não, e sua produção se dá no período da fase estacionária como também pode ser produzido durante o

crescimento do organismo mais precisamente na idiofase (SPECIAN et al., 2014; VINING, 1986).

Para alguns micro-organismos os metabólitos secundários apresentam um fator importante na formação de esporos, pois, a regulação da produção tanto de conídios quanto dos metabólitos secundários se dá por fatores semelhantes, propiciando a geração dos metabólitos durante a esporulação; e isso permite retardar a germinação dos conídios até que haja um ambiente com melhores condições de crescimento e menor competição por nutrientes. Estes metabólitos secundários ativos desempenham um papel de limpeza do ambiente frente aos micro-organismos concorrentes no período de germinação dos conídios (DEMAIN & FAING, 2000).

Como sugerido por DETHIER (1954) e FRAENKEL (1959), o metabolismo secundário apresenta um papel de defesa contra patógenos e contra a herbivoria, predação de partes não reprodutivas de plantas. Segundo WHITTAKER (1975) os aleloquímicos pelos quais um organismo de uma espécie afeta um organismo de outra espécie, são definidos como um subconjunto de metabólitos secundários. Alguns metabólitos secundários apresentam outras funções, por exemplo, proteção contra raios ultravioletas, tolerância à dessecação, transporte de metais entre outros (STAMP, 2003). Alguns desses compostos têm sido empregados no controle biológico de algumas pragas.

A literatura descreve vários estudos indicando a produção de compostos antifúngicos por bactérias, plantas e alguns fungos (BENITEZ et al., 2012; FUENTES 2004; GARRIGUES et al., 2016). Esses compostos bioativos são moléculas biodegradáveis e muito menos nocivas ao meio ambiente (BENITEZ et al., 2012), assim atuando como um biocontrole de menor impacto ambiental. Estudos realizados demonstraram que bactérias produzem metabólitos com propriedades antifúngicas de bastante eficácia (BENITEZ, 2010; BENITEZ et al., 2012).

2.4.1.1. Metabólitos Secundários Bacterianos

As bactérias são reconhecidas pela produção de metabólitos secundários com ação antibiótica. A grande vantagem da possível obtenção destes antibióticos a partir destes micro-organismos está na eficácia que apresentam no tratamento contra fungos (BENITEZ, 2010; BENITEZ et al. 2012).

A literatura tem mostrado que determinadas bactérias produzem compostos que influenciam no crescimento de fungos fitopatogênicos, uma delas são as bactérias do gênero *Bacillus*. Este gênero pertence à família Bacillaceae, apresentam a forma de bastonetes; são gram-positivos, facultativos aeróbios, catalase positivos e produtores de endósporos (MADIGAN et al., 2010). Existem catalogadas até o momento cerca de 268 espécies deste gênero, além de cerca de 7 subespécies (EUZEBY, 1997), as quais têm sido amplamente estudadas por produzirem metabólitos secundários de amplo espectro de atividade antifúngica (YAN et al., 2012) que são produzidos ou pela via NPSP- Nonribosomal Peptide Syntaxis Pathway ou pela via do PKS – Polyketide Synthase (BENITEZ et al. 2012; WONG et al., 2008; WONG & NG, 2009).

Alguns destes lipopeptídios foram identificados e caracterizados, e, em particular, destacam-se a iturina A, bacilomicina, bacilopeptina, surfactina e fengicina (Figura 1).

A família da iturina compõem as iturinas A, C, D e E, bacilomicina D, F, L, bacilopeptina e mycosubtilina. Esta família apresenta uma estrutura similar entre as moléculas, sendo sua estrutura um pentapeptídio ou heptapeptídio cíclico com uma cadeia de ácido graxo contendo de 14 a 17 átomos de carbono (ALVAREZ, 2011; JEMI et al., 2017;). De acordo com MAGET-DANA & PTAK (1990) o mecanismo de ação das moléculas de iturina ocorre quando estas alcançam e penetram a membrana citoplasmática da célula-alvo e desorganizam a bicamada lipídica ativando as fosfolipases. Dentro da membrana, elas formam estruturas oligoméricas (agregados de lipopeptídeos ou agregados do complexo lipopeptídeo-fosfolípido) que formam poros e aumentam com o passar do tempo e permitem o vazamento de K^+ intracelular (MAGET-DANA & PTAK, 1990).

A família da surfactina refere-se àquelas moléculas formadas por um heptapeptídeo ligado a uma cadeia de ácido graxo contendo entre 13 a 16 átomos de carbono. Uma das atividades associadas às moléculas pertencentes a esta família é a de causar alteração na membrana fosfolipídica devido às interações fortes que estabelecem com a membrana, além de serem poderosos surfactantes, por terem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m em uma concentração tão baixa quanto 0,005%, além de apresentar potente atividade antiviral, antitumoral, anticoagulante e bem como inibições enzimáticas (MNIF & GHRIBI, 2015; YAN et al., 2012).

E, finalmente, a família da fengicina, refere-se a lipodecapeptídios cíclicos ligados a uma cadeia de ácido graxo contendo entre 14 a 18 átomos de carbono (saturados ou insaturados), apresentando uma forte ação contra fungos filamentosos. As fengicinas diferem das iturinas e surfactinas pela presença de aminoácidos incomuns, como ornitina e alo-treonina. A variação da posição 6 no anel peptídico em Ala-Val permite diferenciar as estruturas das moléculas pertencentes à família da fengicina em Fengicina A e B e Plipastatina A e B (ALVAREZ, 2011; MNIF & GHRIBI, 2015; ONGENA et al., 2005).

Figura 1: Estrutura da molécula (A) surfactina, (B) fengicina e (C) iturina (MONGKOLTHANARUK, 2012).

2.5. *Bacillus velezensis*

De acordo com RUIZ-GARCÍA e colaboradores (2005), *Bacillus velezensis* é assim denominado por ter sido isolado pela primeira vez do rio Vélez em Málaga, sul da Espanha. Trata-se de uma bactéria gram positiva e é classificada morfológicamente como um bacilo. É produtora de endósporos, os quais são elipsoidais e encontram-se em posições paracentrais ou subterminais. Não contém cristais paraesporais ou acumulam ácido poli-hidroxibutírico. Sua motilidade ocorre por intermédio de flagelos peritricosos.

A bactéria *B. velezensis* é capaz de crescer em concentrações de NaCl até 12% (m/v). Seu crescimento ocorre dentro da faixa de temperatura de 15 a 45 °C e em valores de pH entre 5 e 10 e não crescem em anaerobiose na presença de nitrato ou fumarato, de indol, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase e em lisozima (0.001%, m/v). *B. velezensis* é uma bactéria quimio-organotrófica e produtora das enzimas catalase e oxidase. Também produz ácidos a partir de L-arabinose, celobiose, D-frutose, glicerol, D-glucose, glicogênio, inositol, lactose, maltose, manitol, D-manose entre outros (RUIZ-GARCÍA et al., 2005). Apresenta a capacidade de reduzir nitrato e produzir sulfeto a partir da L-cisteína, hidrolisar sangue, amido, gelatina e caseína (RUIZ-GARCÍA et al., 2005).

Estudos mostraram que *B. velezensis* era considerado um sinônimo heterotípico de *B. amyloliquefaciens* (DUNLAP et al., 2016). O sequenciamento e análises do genoma, morfologia, fisiologia, quimiotaxonômia e filogenética de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, *B. methylotrophicus*, *B. oryzicola* mostraram que estas espécies compartilham do mesmo fenótipo e

genótipo que a espécie *B. velezensis*. Assim, de acordo com DUNLAP e colaboradores (2016) tais espécies deverão ser reclassificadas como sinônimos heterotípicos de *B. velezensis*, já que esta foi descrita na literatura primeiramente do que as outras.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Identificar e caracterizar os metabólitos secundários ativos secretados pela bactéria *Bacillus velezensis* que causam inibição no crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos.

3.2. Objetivos Específicos

1. Identificação filogenética da bactéria de estudo;
2. Realizar ensaios antagonísticos entre *B. velezensis* e o fungo filamentoso *Trichoderma reesei*;
3. Realizar ensaios antagonísticos entre *B. velezensis* e os fungos filamentosos fitopatogênicos *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Bothrytis sp.* e *Moniliophthora perniciosa*;
4. Identificar os metabólitos secundários da bactéria por Cromatografia líquida (UPLC-ESI-IT/MS) e Espectrometria de Massas (ESI-CID/MS).
5. Fracionar o extrato do precipitado do meio de cultura por intermédio de separação em coluna de permeação em gel (SEPHADEX);
6. Analisar os grupos de frações obtidos no fracionamento por meio de Cromatografia líquida (UPLC-ESI-IT/MS);
7. Analisar o efeito antifúngico dos grupos de frações obtidos através da técnica de cromatografia em permeação em gel contra os fungos filamentosos através do ensaio de difusão em ágar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos e Meios de Cultura

4.1.1. Micro-organismos

O micro-organismo utilizado para este trabalho foi a bactéria *Bacillus velezensis* isolada de uma placa contendo o fungo *Trichoderma reesei* QM9414 no Laboratório de Biotecnologia da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo, pelo Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde. A linhagem do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* QM9414 cedida pelo Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde. Algumas espécies do fungo fitopatogênicos *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Aspergillus flavus* e *Botrytis* sp. foram fornecidos pelo Prof. Benedito Correia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ICB-USP. O fungo *Moniliophthora perniciosa* foi cedido pela Prof^a. Dr^a. Cristina Pungartnik do Departamento de Ciências Biológicas do Laboratório de Biotecnologia de fungos do Centro de Biotecnologia e Genética na Universidade Estadual de Santa Cruz em Ilhéus, Bahia. Tais fungos foram escolhidos devido a sua importância frente aos danos que causam na agricultura, além de alguns deles como *F. graminearum*, *F. oxysporum* e *Botrytis* sp. serem considerados de grande importância econômica/científica (DEAN, et al., 2012).

4.1.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados neste trabalho para o crescimento dos micro-organismos foram os meios LB (Tabela 1), para o inóculo da bactéria e o mesmo acrescido de 2% de ágar para a obtenção do meio sólido; PDA (MERCK) para crescimento dos fungos filamentosos.

Para o ensaio referente ao melhor meio de cultura para produção dos metabólitos secundários pela bactéria empregou-se os meios H medium (Tabela 1), Lambda broth (Tabela 1), LB medium (Tabela 1), Tryptone broth (Tabela 1), TY medium 2x (Tabela 1) e o caldo Batata Dextrose (BD). A preparação do caldo BD consiste em 200g de batata cozida em 700 ml de água deionizada, obtendo-se um caldo de batata o qual foi filtrado e transferido para um erlenmeyer de 2 L, o volume final foi ajustado para 1 L, adicionou-se 20g de dextrose e autoclavou-se a 121° C por 20 minutos).

Tabela 1: Reagentes para produção de 1 L dos meios de cultura usados neste trabalho:

<u>Componentes</u>	LB	LB medium	Lambda broth	Caldo BD	H medium	Tryptone broth	TY medium 2X
<u>Ágar</u>	10 g						
<u>Batata Baraka</u>				200g			
<u>Dextrose</u>				20 g			
<u>Extrato de Levedura</u>	5 g	5 g					10 g
<u>NaCl</u>	5 g	5 g	2,5 g		8 g	5 g	5 g
<u>NaOH 1M</u>		1 mL					
<u>Triptona</u>	10 g	10 g	10 g		10 g	10 g	16 g
<u>H₂O qsp</u>	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L

4.2. Ensaios Antagonísticos *in vitro*

4.2.1 Ensaio Antagonísticos entre *B. velezensis* e o fungo *Trichoderma reesei*

Os ensaios com *T. reesei* QM9414 foram realizados utilizando-se uma suspensão estoque de esporos, a qual foi produzida a partir de uma suspensão anterior, da qual pipetou-se 3 µL em meio de cultura PDA. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 7 dias e, após este período, os conídios contidos na placa foram resuspendidos em 10 mL de NaCl 0,9%, homogeneizados e quantificados em câmara de Neubauer, obtendo-se na contagem a média de 4×10^8 conídios/mL.

Realizou-se a quantificação bacteriana através da leitura de OD₆₀₀ em espectrofotômetro. Utilizou-se o meio de cultura LB onde a bactéria foi plaqueada e incubada a 37° C por 16 h e após inoculada em 5 mL de LB líquido. Uma alíquota da cultura teve absorbância medida em espectrofotômetro para determinação do número de células/mL da bactéria, o qual foi de $3,49 \times 10^8$ células/mL.

Para o teste antagonístico de atividade antifúngica entre *B. velezensis* e o fungo *T. reesei* QM9414, utilizou-se o meio PDA (MERCK). Em extremidades opostas de placas distintas de PDA foram pipetadas uma alíquota de 2 µL (8×10^5 cel/ml), 4 µL ($1,6 \times 10^6$ cel/ml), 6 µL ($2,4 \times 10^6$ cel/ml), 8 µL ($3,2 \times 10^6$ cel/ml) e 10 µL (4×10^6 cel/ml) das células bacterianas (em placas distintas) e na outra extremidade, de cada placa, pipetou-se uma alíquota de 3 µL ($1,047 \times 10^6$ conídios/ml) do fungo *T. reesei*, enquanto na placa controle somente continha os conídios do fungo. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por um período de 7 dias.

4.2.3. Ensaio Antagonísticos entre *B. velezensis* e os fungos fitopatogênicos

Para o teste antagonístico entre *B. velezensis* e os fungos fitopatogênicos *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *A. flavus*, *M. perniciosus* e do fungo *Bothrytis* sp. utilizou-se 25 ml de meio de cultura PDA (MERCK) em cada placa de petri. Em uma mesma placa de PDA, foram pipetadas em suas extremidades uma alíquota 3 µL ($1,047 \times 10^6$ cel/ml) de células bacterianas e depositado um disco micelial (6 mm de diâmetro) com conídios dos fungos crescidos por 7 dias no centro da placa. As placas controles somente continham os discos de 6 mm de conídios dos fungos. Todas as placas foram incubadas à temperatura ambiente por um período de 7 a 11 dias.

4.3. Obtenção dos Metabólitos Secundários de *B. velezensis*

4.3.1. Meio de cultura para produção de metabólitos secundários

Cerca de seis meios de cultura específicos para cultivo bacteriano foram escolhidos e testados sendo eles H medium, Lambda broth, LB medium, Tryptone broth, TY medium 2 x e o caldo BD produzido pelo Professor Doutor Cleverson Busso para que entre eles fosse escolhido o meio mais adequado para produção dos metabólitos secundários de interesse deste estudo.

Os meios de cultura escolhidos, exceto o caldo BD, foram meios ricos descritos no Short Protocols in Molecular Biology (1992), pois, a maioria dos trabalhos escolhiam meios deste tipo para este propósito.

Cada meio de cultura foi inoculado com a bactéria e colocado sobre agitação a 140 rpm por 96 h a 30° C, como descrito por AYED et al. (2014) e CHEN et al., (2008), porém, o tempo foi ajustado para as condições disponíveis em laboratório. Após estes meios foram centrifugados em centrífuga refrigerada HITACHI Himac CR21F a 8.000 rpm, com o rotor R10A durante 20 minutos à 4° C. Transferiu-se o sobrenadante de cada meio para erlenmeyers limpos, para que fossem filtrados a vácuo com filtro millipore de poros 0.22 µm para eliminar possível presença da bactéria no meio.

4.3.1.1. Obtenção das Frações Orgânicas

Para obtenção dos metabólitos secundários produzidos pela bactéria, submeteu-se 1 L do sobrenadante do meio de cultura a um processo de extração por partição. Empregou-se como solvente extrator 1 L de clorofórmio. A mistura foi agitada manualmente, em seguida, mantida em repouso até total separação entre as duas fases formadas sendo elas orgânica e aquosa. A fração orgânica passou por este procedimento por mais duas vezes, a fim de se obter uma maior quantidade dos metabólitos secundários. A fração orgânica foi transferida para um balão de fundo redondo para eliminação do solvente orgânico em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 45° C. Após a evaporação, obteve-se um líquido viscoso amarelado que foi analisado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

4.3.1.2. Triagens Cromatográficas

As placas de CCD e Cromatografia em Camada Preparativa (CCP) (Merck Sílica gel G e GF254, sobre vidro) e cromatofolhas de alumínio de sílica gel Fluorescence UV 20 x 20 cm (CAT no. 4020222, Whatman) foram reveladas sob luz UV (254 e 365nm) e em seguida borrifadas com solução de anisaldeído sulfúrico modificado (Merck, 1971). Este último revelador é considerado universal por ter a capacidade de detectar diferentes classes de metabólitos secundários em diferentes colorações.

4.3.2. Produção dos metabólitos secundários por *B. velezensis*

Para extração dos metabólitos secundários, a bactéria *B. velezensis* foi plaqueada em meio LB acrescido de ágar e incubada a 37° C por 14 h. Após este período, com o auxílio de uma alça, retirou-se uma quantidade de células bacterianas para a inoculação em caldo BD, distribuído em 5 erlenmeyers (1L) contendo 200 mL do meio. Para aeração dos meios, estes foram mantidos sob agitação em shaker a 140 rpm com temperatura de 30 ° C por 96 h como descrito por AYED et al. (2014) e CHEN et al., (2008), porém, o tempo foi ajustado para as condições disponíveis em laboratório. Em seguida estes meios foram centrifugados em centrífuga refrigerada HITACHI Himac CR21F a 8.000 rpm, com o rotor R10A durante 20 minutos à 4° C. Transferiu-se o sobrenadante destes 5 frascos para um único erlenmeyer (1L) para então, ser efetuada a filtração a vácuo com filtros millipore de poros 0,22 µm para eliminar possível presença da bactéria no meio. O meio foi mantido sob refrigeração a 4° C até o processo da extração dos metabólitos secundários presentes no mesmo.

4.4. Identificação Bacteriana

4.4.1. Extração do DNA

Utilizou-se para preparação e extração do DNA genômico da bactéria o protocolo CTAB modificado descrito por HAYNES (2012).

Inoculou-se a bactéria em 5 mL de LB, à 37° C por 12 h. Após este período, transferiu-se 1,5 mL do inóculo para um tubo de microcentrífuga, o qual foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min à temperatura ambiente; descartou-se o sobrenadante e o pellet foi resuspendido com Tampão TE (Tris 0,5 M; EDTA 10 mM). Ajustou-se a OD₆₀₀ para 1 com tampão TE e transferiu-se cerca de 740 µl das células para um novo tubo de microcentrífuga e a este adicionou-se 20 µl de lisozima (100 mg/mL). À mistura, incorporou-se 40 µL de SDS 10% e 8 µL Proteinase K (10 mg/mL) e incubou-se por 1 hora a 56° C.

Posteriormente, adicionou-se 100 µL NaCl 5 M e 100 µL de CTAB/NaCl (10%/0,7M) e incubou-se a 65° C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), misturou-se, e então, centrifugou-se durante 10 min à temperatura ambiente. Coletou-se a fase aquosa que foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v), misturou-se e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se de 0,6 volumes de isopropanol a -20° C por 2 horas para precipitação do DNA.

Em seguida, a amostra foi centrifugada por 15 min em 12.000 rpm a 4° C, descartou-se o sobrenadante e ao pellet adicionou-se etanol 70% a -20° C, e a amostra novamente passou por centrifugação a 4° C em 12.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet deixado em temperatura ambiente para evaporação do etanol restante.

Ao pellet adicionou-se 170 µl de EB buffer do QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) e 1 µL de RNase A, centrifugou-se rapidamente (um pulso) e incubou-se por 1 hora a 37° C. Para a inativação da enzima RNase A; a amostra foi incubada posteriormente a 70° C por 15 min e o tubo em seguida foi levado ao gelo.

Para o processo de precipitação aplicou-se 0,1 volume de 3 M de acetato de sódio ao tubo com a amostra e ressuspendeu-se. Adicionou-se cerca de 2,5 volumes de etanol 100% e o tubo foi levado novamente para ser centrifugado apenas com um pulso para misturar os reagentes à amostra. Em seguida, deixou-se a amostra a -80° C por 30 min para precipitação do DNA e, após este período, centrifugou-se por 20 min em 10.000 rpm à 4° C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e ao pellet novamente adicionou-se etanol 70% gelado e centrifugou-se a 4° C por 5 min a 10.000 rpm. Descartou-se o etanol e deixou-se o tubo aberto para evaporação do etanol restante. Por fim, ressuspendeu-se o pellet em 100 µl de Tampão TE e realizou-se uma eletroforese em gel de agarose de alíquota de 5 µl da amostra.

4.4.1.1. Eletroforese em gel de agarose

Preparou-se o gel de agarose 1% em tampão TBE (45 mM Tris-Borato, 1mM EDTA pH 8.0) contendo 2,5 µl de corante de DNA SYBR SAFE (ThermoFisher Scientific). As corridas de eletroforese

em tampão TBE ocorreram a 100 V por 40 min. Os fragmentos de DNA foram visualizados em transiluminador de luz azul Safe Imager Transluminator S37102 (Invitrogen Corporation).

4.4.2. PCR e Purificação

Para a amplificação do gene 16S rDNA do DNA genômico de *Bacillus velezensis*, utilizou-se primers específicos para esta região conservada do DNA. Utilizou-se o primer forward fD1 (5' - CCGAATTTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e o primer reverse rD1 (5' - CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC - 3') descrito por WEISBURG e colaboradores (1991). Para a realização da PCR usou-se o aparelho Eppendorf® Mastercycler personal. A preparação da reação de PCR seguiu as recomendações indicadas pelo fabricante da enzima *Go Taq® DNA Polimerase* (Promega).

A reação de PCR em 50 µl foram nas seguintes condições: 30 ciclos consistindo de desnaturação à 95° C por 2 minutos, pareamento a 42° C por 30 segundos e elongação a 72° C por 1 minuto e 40 segundos. Por fim, um ciclo adicional de 5 minutos foi inserido para a extensão final e deixou-se a amostra a 4° C por tempo indeterminado. A visualização e separação das bandas do DNA foi feita em gel de agarose 1% usando voltagem de 100 V por 40 min e posterior visualização no MultiDoc-It M-16 (UVP).

Após eletroforese, purificou-se o DNA amplificado com *Qiaquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.3. Sequenciamento do DNA

Submeteu-se o produto purificado ao sequenciamento Sanger (Sanger 1977), com o auxílio do sequenciador automático ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems™) no Laboratório de Genômica e Elementos Transponíveis (GATe) (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo). Para isto preparou-se um mix de sequenciamento para a amostra de 16S rDNA cuja qual foi dividida em dois tubos. No tubo 1 colocou-se o mix que foi preparado utilizando-se de 3 µL de água MilliQ estéril, 2 µL de Buffer (5x), 2 µL de primer forward fD1 e 1 µL de BigDye (BigDye V3.1 Cycle - Thermo Fisher Scientific). Para o tubo 2, colocou-se o mesmo mix, porém, utilizou-se 2 µL do primer reverse rD1. As soluções foram submetidas ao seguinte ciclo de sequenciamento: 95° C por 90 s, seguido de 35 ciclos de 95° C por 18s, 55° C por 12 s e 60° C por 4min.

A precipitação dos produtos obtidos, foram realizadas adicionando-se aos mesmos 2 µL EDTA 125mM, 2 µL acetato de sódio 3 M e 50 µL de etanol 100% e homogenizou-se. Após homogenização incubou-se a temperatura ambiente por 15 min. Após este tempo centrifugou-se a amostra por 45 min a 4.000 rpm á 24° C e descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 70 µL de etanol 70% a amostra. Após a adição do etanol centrifugou-se a amostra por 15 min a 4.000 rpm á 24° C e seu sobrenadante foi

novamente descartado e a amostra foi levada para estufa a 30° C até todo etanol evaporar, e em seguida ressuspendeu-se amostra em 10 µL formamida.

4.4.4. Qualidade das Sequências, Alinhamento Múltiplo e Análise Filogenética

Todas as sequências obtidas passaram por análise de qualidade por intermédio dos pacotes phred, phrap/cross_match/swat e consed/Autofinish (EWING & GREEN 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al. 1998; GORDON, 2001; GORDON, 2004) utilizando valores de qualidade iguais ou superiores a 20 (phred 20). Logo após a obtenção dos *contigs* de alta qualidade, as sequências-consensos foram exportadas e checadas com o auxílio do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al. 1990).

Para o alinhamento múltiplo, obtiveram-se sequências do GenBank de diferentes espécies do gênero *Bacillus* (Anexo 1), as quais foram adicionadas as sequências originais produzidas neste estudo. As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal Ω (SIEVERS, et al. 2011) com dois ciclos de múltiplas interações (10 e 100), cada uma com 20 processos paralelos independentes.

Realizou-se as análises filogenéticas usando o método de neighbor-joining (SAITOU & NEI 1980) com o programa MEGA 7 (KUMAR et al. 2015) e o modelo de evolução molecular K2P (KIMURA, 1980). Estimou-se o suporte dos ramos através de 1000 réplicas de *bootstrap* não-paramétrico (FELSENSTEIN, 1985) e utilizou-se os seguintes intervalos: suporte baixo de <50%, moderado ≥ 50% e < 75% e alto > 75% e ≤ 100%.

4.5. Análises Químicas

4.5.1. Obtenção da Fração Orgânica

Mediante o resultado do experimento realizado com os seis diferentes meios de cultura para o cultivo bacteriano, estabeleceu-se o caldo BD como sendo o que o melhor se adequou para a maior produção dos metabólitos secundários. Assim, submeteu-se 1 L de sobrenadante obtido no processo de extração por partição de acordo com o protocolo descrito no tópico 4.3.1.1. Após a eliminação do solvente orgânico em rotaevaporador sob pressão reduzida, obteve-se, um líquido viscoso de cor amarelada (0,0101 g; FrOrg), a qual foi analisada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para análise qualitativa da amostra.

4.5.2. Triagens Cromatográficas

A triagem cromatográfica da fração orgânica bioativa obtida seguiu o protocolo descrito no tópico 4.3.1.2.

4.5.3. Purificação da Mistura de Metabólitos Antifúngicos

Várias misturas de solventes orgânicos foram testadas com fases móveis para o estabelecimento da melhor condição cromatográfica a ser utilizada para a separação dos metabólitos secundários presentes na FrOrg. Assim, a melhor separação entre os compostos foi empregando-se a fase móvel a partir da mistura de solvente hexano/acetato de etila nas proporções de 8:2 (v/v). Em seguida, aplicou-se a fração orgânica bioativa em uma placa cromatográfica em escala preparativa (CCP) através do uso de um capilar, reservando à direita desta placa como uma região guia, já que nem todas substâncias absorviam na região do ultravioleta. Em seguida, a placa foi eluída em uma cuba previamente saturada com a fase móvel selecionada. Utilizando-se uma placa de vidro transparente, recobriu-se a região à esquerda da placa preparativa, e em seguida esta foi aderida através do uso de fita adesiva, mantendo-se livre a região guia (Fig.2), a qual foi revelada em anisaldeído sulfúrico modificado e então, aquecida com um soprador térmico STV 1500 Vonder por 10 s. Através da revelação da região guia (região direita da placa), foi possível estimar o R_f de três metabólitos secundários na região esquerda desta mesma placa. Estes foram circundados e raspados com o auxílio de uma espátula e transferidos diretamente para erlenmeyer (50 mL), os quais foram extraídos utilizando-se como solvente clorofórmio. Para obtenção dos metabólitos isolados, as misturas foram filtradas e levadas à secar a 45° C, porém somente uma apresentou quantidade suficiente para análises posteriores (0,002 g, a qual corresponde ao (s) metabólito (s) da fração).

Figura 2: Representação da placa de cromatografia em camada preparativa (CCP). Retângulo em preto com a amostra aplicada (linha e círculo em amarelo). Lado direito da placa preparativa, região com spot que serviu como fração guia para revelação em anisaldeído. Retângulo em azul, representação da placa de vidro aderida a região do isolamento para preservação dos metabólitos secundários.

4.5.4. ESI-MSⁿ análise

Realizou-se análise por injeção direta da amostra FrOrg em um analisador ion-trap linear

Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), tanto em modo positivo como negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se capilar metálico, fonte a 280° C, voltagem do spray de 5,00 kV, voltagem do capilar de - 35 V, tube lens -100 V e fluxo de 5,0 µL/min. Registrou-se a análise completa de varredura na faixa de 100-2000 m/z .

Fragmentações em vários estágios das moléculas (ESI-MSⁿ) foram realizadas usando o método CID (collision induced dissociation). Utilizou-se o gás hélio para a colisão contra os íons precursores. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons naquela faixa m/z . O segundo evento de varredura foi um experimento MS/MS realizado usando uma varredura dependente de dados nas moléculas ionizadas a partir das substâncias de m/z 1059, 1045 e 1031 de interesse, em uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons produto foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até que não foram observados mais fragmentos.

4.6. Análises e Fracionamento por permeação em gel

Para análise e fracionamento dos metabólitos secundários produzidos pela bactéria de estudo, fazia-se necessário uma considerável quantidade de massa de metabólitos para se dar continuidade no estudo químico e biológico. Para isto, seguimos o protocolo descrito por BENITEZ et al. (2010) e PECCI et al. (2010) para obtenção de massa.

4.6.1. Precipitação Ácida.

Para obtenção de massa acidificou-se 6 L do sobrenadante (pH 6,5) obtido do cultivo bacteriano em caldo BD com ácido clorídrico 6 M, ajustando-se o pH até 2. A solução foi mantida a temperatura de 4° C por 24 h para precipitação. Após precipitação, o sobrenadante foi centrifugado a 8.000 rpm a 4° C por 20 min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado por 4 x com água deionizada e seu pH foi novamente ajustado para 6,5 com adição de hidróxido de sódio 6 M. Assim, a mistura foi centrifugada, descartando-se o sobrenadante e o precipitado foi mantido a -20° C.

4.6.2. Fracionamento dos Metabólitos Oriundos do Precipitado

De acordo com o protocolo descrito por YE et al. (2012), cerca de 2,6 g do precipitado foi submetido a 2 extrações com 13 mL de metanol. Após a evaporação do solvente, o precipitado foi resuspendido em 12 mL de metanol. A solução foi transferida para uma coluna de permeação em gel (100 cm x 5 cm), Sephadex LH-20 (Pharmacia), a qual foi eluída em metanol (grau HPLC). Foram coletadas 63 frações de 5 mL cada. Cerca de 6 µL de cada fração foi aplicada em CCD, utilizando-se

como fase móvel a mistura de clorofórmio/metanol/água nas proporções de 80:18:2 (v/v), e em seguida as placas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico modificado (Sannomiya et al., 2005).

As frações que apresentaram os perfis cromatográficos semelhantes foram unidas em grupos de frações, as quais após a evaporação do solvente resultaram em FrSph1 (24 mg), FrSph 2 (13,9 mg), FrSph 3 (93 mg) e FrSph 4 (44,4 mg).

4.7. UPLC-ESI-IT-MS análise

Para as análises em UPLC-ESI-IT-MS, cada fração (2,0 mg) foi ressuspensa em 1 mL de MeOH grau HPLC e filtrado em cartucho Sep-Pack.

As análises em UPLC-ESI-IT-MS foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da Thermo Scientific, consistindo em um amostrador automático Accela AS, uma bomba (Accela 600) quaternária acoplada com o espectro de massa LTQ XL descrito acima, operando nas mesmas condições. Foram injetadas alíquotas de 10 µL de cada amostra usando o amostrador automático. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna apolar (Kinetex® core-shell, C₁₈, 1,7 µm, 100 x 2,1 mm, Phenomenex, EUA) à temperatura ambiente. As fases móveis consistiram no eluente A (0,01% de ácido fórmico em água, v / v) e o eluente B (0,01% de ácido fórmico em metanol, v/v). Estes eluentes foram injetados em um fluxo de 0,350 mL.min⁻¹ em gradiente linear: 50-100% B de 0 a 5,0 min. Após atingir 100% de B, esta condição foi mantida por 3 min.

4.8. Ensaio de Atividade Antifúngica com os grupos de Frações

O ensaio de difusão em ágar para teste da atividade antifúngica com as frações obtidas do fracionamento em coluna Sephadex foi realizado segundo o protocolo descrito por BENITEZ et al. (2010) e YE et al. (2012).

O experimento foi realizado em meio PDA (MERCK) e em duplicata, no qual discos de papéis (6 mm de diâmetro) estéreis foram aplicados 2 cm a partir do centro da placa de petri. Alíquota de 10 µL (1mg.mL⁻¹) de cada fração a ser testada foi dissolvida em DMSO, e então aplicadas isoladamente em seus respectivos discos. Cada disco foi designado com sua fração correspondente, sendo elas: 1 (FrSph 1), 2 (FrSph 2), 3 (FrSph 3), 4 (FrSph 4) e C para o controle em DMSO. Pipetou-se no centro da placa de petri 10⁴ conídios/mL dos fungos usados neste estudo. Em seguida foi realizada a incubação das placas, as quais foram mantidas a 25° C ± 2 por 4 dias até que o crescimento micelial cobrisse o disco C (DMSO). Apenas o fungo *M. perniciosus* demorou 10 dias para atingir o padrão descrito no protocolo, pois, seu crescimento é lento.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação Bacteriana

5.1.1 Extração do DNA Genômico, PCR e Purificação

Para a confirmação da extração do DNA genômico da bactéria realizou-se uma eletroforese em gel de agarose (Fig. 3A). Após a extração do DNA a região 16S rDNA foi amplificada por PCR, obtendo-se uma banda de, aproximadamente, 1500 pb como produto da amplificação (Fig. 3B). O produto da amplificação passou por um processo de purificação para posterior sequenciamento de DNA e sua presença foi confirmada em gel de agarose, aplicando-se 2μL do produto purificado (Fig. 3C).

Figura 3: Confirmação da extração do DNA genômico e amplificação do gene 16S rDNA por eletroforese. 1. Padrão de peso molecular 1 kb DNA Ladder Plus (ThermoFisher); 2. Amostras do DNA da bactéria. A) DNA genômico obtido através do protocolo CTAB modificado (seta, canaleta 2). B) Produto da amplificação da região 16S rDNA (seta à direita indica o produto de PCR na canaleta 2). C). Produto da amplificação da região 16S rDNA purificado (seta, canaleta 2).

5.1.2. Árvore Filogenética e Identificação Molecular

A reconstrução filogenética com base na sequência do gene 16S rDNA da bactéria, indicou que a mesma provavelmente seja *Bacillus velezensis* (Fig. 4) dado o nível de suporte (moderado).

é possível constatar que o composto secretado pela bactéria tem efeito inibitório contra o fungo filamentoso (Fig. 5), e que as diferenças nas concentrações não influenciaram no tamanho do halo formado.

Figura 5. Ensaio antagonístico entre *B. velezensis* e *T. reesei* QM9414. Cultura saturada da bactéria aplicada nos volumes indicados e, cultura do fungo aliquotado de 3µL sobre placas PDA, que foram incubadas por 7 dias, em temperatura ambiente.

5.2.3. Efeito antagonístico de *B. velezensis* contra fungos filamentosos fitopatogênicos

Para avaliação da atividade antifúngica de *B. velezensis* frente aos fungos filamentosos fitopatogênicos *A. flavus*, *Botrytis* sp.; *F. graminearum*; *F. oxysporum*; *F. verticillioides* e *M. perniciosa* semeou-se os fungos com a bactéria em placas distintas, e comparou-se o crescimento dos fungos das placas controles com o crescimento dos fungos na presença da bactéria. Foi possível constatar que o (s) composto (s) secretado (s) pela bactéria tem (têm) efeito inibitório contra todos os fungos fitopatogênicos testados (Fig.6).

Figura 6. Ensaio de atividade antagonística entre *B. velezensis* e os fungos fitopatogênicos (A) *Aspergillus flavus* ATCC:204304, (B) *Botrytis* sp., (C) *M. pernicioso*, (D) *Fusarium graminearum*, (E) *F. oxysporum* e (F) *F. verticillioides*. Aliquotou-se 3 µL da cultura saturada da bactéria e aplicou-se em placas PDA (coluna direita) e adicionou-se ao centro da placa um disco de 6 mm com esporo dos fungos. Como controle aplicou-se um disco de 6 mm de conídios do fungo sobre a placa (coluna esquerda). As placas foram encubadas de 7 a 11 dias em temperatura ambiente.

5.3. Análises Químicas

5.3.1. Seleção do meio de cultura para Produção de Metabólitos Secundários pela bactéria

O cultivo da bactéria *B. velezensis* foi testado em diferentes meios de cultura, sendo eles TY medium 2x; LB medium; H medium, Lambda broth, Tryptone broth e caldo BD. Após o processo de extração e triagem cromatográfica por CCD, observou-se que em caldo BD, houve uma maior produção de metabólitos secundários pela bactéria do que nos demais meios. Como é possível visualizar na indicação da seta da na Fig.7.

Figura 7. Análise cromatográfica por CCD dos extratos obtidos dos diferentes meios de culturas testados para produção dos metabólitos secundários pela bactéria *B. velezensis*. 1) Metabólitos Secundários obtidos em caldo BD; 2) Metabólitos Secundários obtidos em TY medium 2x; 3) Metabólitos Secundários obtidos em LB medium; 4) Metabólitos Secundários obtidos em H medium; 5) Metabólitos Secundários obtidos em Tryptone broth; 6) Metabólitos Secundários obtidos em Lambda broth.

Placa sílica gel, fase móvel: hexano/acetato 8:2 (v/v) e revelador anisaldeído sulfúrico modificado

5.3.2. Obtenção da fração antifúngica

O sobrenadante, obtido da fermentação da bactéria em meio BD, foi submetido à consecutivas extrações por partição utilizando clorofórmio como solvente. A mistura foi separada em funil de separação, obtendo-se assim a fração orgânica (FrOrg). Para eliminação do solvente orgânico foi utilizado um sistema de rotaevaporação sob pressão reduzida. Após testar várias fases móveis das diferentes misturas de solventes como hexano/acetato de etila, clorofórmio/metanol e clorofórmio/metanol/água em diferentes proporções, a melhor resolução para separação dos metabólitos ali presentes, foi utilizando-se a mistura de hexano/acetato de etila 8:2 (v/v). A revelação da placa de CCD sob luz ultravioleta no comprimento de onda 365 nm mostrou que existência de um ou mais compostos de Rf igual 0,18 com coloração amarelo brilhante (Fig. 8). Este (s) composto (s) absorvem também em 254 nm.

Figura 8. Análise por CCD e revelação por luz ultravioleta nos comprimentos de ondas de 254 e 365 nm.

Placa (A) revelação da placa CCD em 254 nm; Placa (B) Revelação da placa em 365 nm

Ao utilizar como revelador a solução de anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento, observou-se a revelação de 2 metabólitos de colorações rosada com Rf de 0,18 e 0,44 e dois outros “spots” amarelados com Rfs 0,62 e 0,82 (Fig. 9), os quais não eram reveláveis sob luz ultravioleta a 254 e 365 nm (Fig. 8). Através desta análise por CCD é possível observar que o composto com Rf 0,44, é o majoritário nesta fração.

Figura 9. Análise por CCDC da fração do extrato contendo o princípio bioativos. “Spots” de metabólitos presentes na fração com os seus respectivos Rfs indicados.FM: hexano/acetato de etila 8:2 (v/v) e revelação em anisaldeído sulfúrico.

Placa sílica gel, fase móvel: hexano/acetato 8:2 (v/v) e revelador anisaldeído sulfúrico modificado

5.3.3. Purificação dos compostos presentes na fração orgânica bioativa (FrOrg)

Para a purificação dos compostos presentes na FrOrg de *B. velezensis*, a fração foi diluída em 7 mL de clorofórmio, e aplicada em uma placa de sílica gel em escala preparativa CCDP. Após eluição cromatográfica e recobrimento parcial da porção 1 da placa, e revelação em anisaldeído sulfúrico (Fig. 10), foi possível a visualização de um largo “spot” rosado na região guia, permitindo assim delimitar esta mesma substância a porção 1 desta placa. Obtendo-se desta forma o (s) composto (s) isolado (s).

Figura 10. Placa cromatográfica em escala preparativa para purificação da FrOrg. (1) Região a ser isolada da mistura. Retângulo em rosa representa a região que foi raspada da placa. Fase móvel utilizada Hexano/Acetato 8:2. (2) Região guia revelada com anisaldeído contendo o composto majoritário.

Placa sílica gel, fase móvel: hexano/acetato 8:2 (v/v) e revelador anisaldeído sulfúrico modificado

Para averiguação da efetividade da separação e/ou da pureza do composto isolado, realizou-se uma nova CCD nas mesmas condições cromatográfica previamente estabelecidas (Fig. 11).

Figura 11. CCD referente ao purificado da FrOrg de *B. velezensis*. Fase móvel: Hexano/acetato 8:2 (v/v), revelação em anisaldeído sulfúrico.

Placa sílica gel, fase móvel: hexano/acetato 8:2 (v/v) e revelador anisaldeído sulfúrico modificado

5.4. Análise por UPLC-MS e ESI-CID/MSⁿ

5.4.1. Perfil cromatográfico por UPLC-MS da FrOrg

A análise por UPLC-ESI-IT-MS da FrOrg de *B. velezensis* indicou a presença de pelo menos, 6 picos nesta mistura (Fig.12).

Figura 12. Cromatograma obtido por UPLC-MS da fração orgânica bioativa de *B. velezensis*.

O cromatograma do íon extraído de m/z 1045, indicou a presença de mais de uma molécula com esta mesma massa carga (Fig. 13).

Figura 13. Cromatograma do íon extraído obtido por UPLC-MS do íon de m/z 1045.

5.4.2. Full scan ESI-CID/MS da FrOrg

A análise por injeção direta de espectrometria de massas (ESI-CID/MS) do meio de cultura (branco) mostrou o seguinte perfil (Fig. 14).

Figura 14. Full scan ESI-MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do meio de cultura (branco) extraído com clorofórmio.

O qual foi usado como controle diante dos outros experimentos de espectrometria.

A análise da FrOrg mostrou um grupo de picos, dos quais os picos mais proeminentes foram os de m/z 1031, 1045, 1059, 1060 e 1081 (Fig. 15), dentre estes, apenas os picos de m/z 1031, 1045 e 1059, foram estudados. Estes picos foram selecionados para realização dos experimentos de ESI-MSⁿ.

Figura 15. Full scan ESI-MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas da fração clorofórmica dos metabólitos de *B. velezensis*.

Vários experimentos de MSⁿ para cada um destes picos foram adquiridos para que estes auxiliassem na determinação estrutural dos metabólitos secundários presentes na fração orgânica.

5.4.2.1. Íon $[M+Na]^+$ m/z 1059

O experimento de MS² a partir do íon de m/z 1059 gerou vários fragmentos, dentre eles o de m/z 1041 que equivale a perda de uma molécula de H₂O. O íon m/z 946, indicando perda de 113 Da, cujo fragmento corresponde a uma leucina/isoleucina. O fragmento de m/z de 708 refere-se à perda 351 Da, o qual corresponde à perda da cadeia do ácido graxo contendo quinze carbonos (C₁₅) associada uma unidade de glutamato (Fig. 16).

Figura 16. Experimento MS² realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) espectro de massas do íon m/z 1059. E a clivagem mostrando a perda de uma leucina e cadeia de ácido graxo C₁₅.

A partir do íon produto de m/z 946 realizou-se um novo experimento, o qual promoveu a formação do fragmento de m/z 833, indicando novamente a perda 113 Da de uma outra leucina da estrutura da molécula (Fig. 17). Esta fragmentação gerou também o íon produto de m/z 815 e o íon produto m/z 718, os quais correspondem respectivamente a perda de uma molécula H₂O e de um ácido aspártico (115 Da) (Fig. 18).

Figura 17. Experimento MS³ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon de m/z 946. E a clivagem mostrando a perda de uma leucina.

Figura 18. Experimento MS⁴ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon de m/z 833. E a clivagem mostrando a perda de um aspartato e uma molécula de H₂O.

Realizou-se o MS⁴ do íon produto de m/z 718, o qual gerou o íon produto de m/z 619, indicando a presença de uma valina na estrutura da molécula, através da perda de 99 Da (Fig. 19).

Figura 19. Experimento MS⁵ realizado por ESI-CID/MS ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 718 gerando o pico 619 equivalendo à perda de uma valina.

O MS a partir do íon m/z 708 que trata-se da segunda via de fragmentação, mostrou a formação do íon produto de m/z 595, o qual corresponde a perda de 113 Da, e, portanto, a perda de uma outra unidade de leucina (Fig. 20).

Figura 20. Experimento MS³ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon 708 gerando o íon de m/z 595 equivalente à perda de uma leucina.

Realizou-se o MS⁴ do íon produto de m/z 595, o qual gerou o íon produto de m/z 481, indicando a presença de uma valina na estrutura da molécula, através da perda de 99 Da (Fig. 21).

Figura 21. Experimento MS⁴ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo do espectro de massas do íon produto de m/z 595 gerando o pico 481.

A perda de uma molécula de água a partir do íon m/z 481 é observada através do experimento de MS⁵ (Fig. 22) formando o íon produto de m/z 464.

Figura 22. Experimento MS⁵ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de m/z 481 gerando o íon produto de m/z 464.

Estes dados permitem sugerir que a molécula se refere ao heptapeptídeo surfactina (**1**) (Tabela 2).

5.4.2.2. Íon $[M+Na]^+$ m/z 1031

Alguns experimentos foram realizados para a determinação estrutural da molécula de m/z 1031, de modo análogo àqueles descritos anteriormente para a molécula de m/z 1059.

O experimento de MS² a partir do íon de m/z 1031 (Fig. 23), gerou vários fragmentos, dentre eles o de m/z 1031 que gerou m/z 1013, o qual refere-se à perda de uma molécula de H₂O. O íon de m/z 918, indica a perda de 113 Da, cujo fragmento corresponde à uma leucina/isoleucina. A partir do íon produto de m/z 918, observou-se também os fragmentos de m/z 805 e 787, o qual indicam a perda 113 Da de uma outra leucina, e de uma molécula de H₂O, respectivamente (Fig. 23). O fragmento de m/z de 708 refere-se à perda 351 Da, o qual corresponde à perda da cadeia do ácido graxo (C₁₃) associada a uma unidade de glutamato. Os íons de m/z 594 e 464 correspondem às perdas de duas leucinas consecutivas e uma molécula de água, as quais pertencem à cadeia lateral de ácido graxo (Fig. 23).

Figura 23. Full MS² ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do íon produto de m/z 1031. As marcações em azul correspondem a perda de duas.

O experimento de MS³ a partir do íon de m/z 787, observou-se a formação do íon-produto de m/z 689, indicando a perda de 115 Da, a qual equivale a uma unidade de ácido aspártico (Fig. 24).

Figura 24. Experimento MS³ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de m/z 918 gerando o íon produto de m/z 805 (787) a partir do íon m/z 787 a geração do íon de m/z 689

O MS³ a partir do íon m/z 689, mostrou a formação dos íons produtos de m/z 672 e de m/z 590, os quais correspondem as perdas de uma molécula de H₂O e de uma valina, respectivamente (Fig. 25).

Figura 25. Experimento MS³ realizado por ESI-CID/MS ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de m/z 689 (672) gerando o íon produto de m/z 590.

Estes dados permitem sugerir que a molécula se refere ao heptapeptídeo surfactina (2) (Tabela 2).

5.4.2.3. Íon $[M+Na]^+$ m/z 1045

As análises para o íon de m/z 1045 foram realizadas de modo análogo aos outros íons anteriormente descritos. Este íon passou por clivagem e seus fragmentos foram analisados (Fig. 26). Um dos produtos da fragmentação do íon 1045 foi o íon produto de m/z 932, o qual refere-se à perda de uma leucina/isoleucina (113 Da) (Fig. 26).

Figura 26. Full MS² ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 1045.

O MS³ do íon de m/z 932 gerou o íon produto de m/z 819 e este corresponde à perda de 113 Da, cujo o fragmento refere-se à perda de outra unidade de leucina (Fig. 27)

Figura 27. Experimento MS³ realizado por ESI-CID/MS ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 932 o qual gerou o íon produto de m/z 818.

O experimento de MS⁴ do íon produto de m/z 819, gerou o íon produto de m/z 703, indicando a perda sequencial de um aspartato na estrutura da molécula, através da perda de 115 Da (Fig. 28).

Figura 28. Experimento MS⁴ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 819. De acordo com a fragmentação obteve-se o íon produto de m/z 703.

Por outro lado, o experimento de MS⁵ do íon produto de m/z 703, gerou o íon produto de m/z 605, indicando presença de mais uma valina na estrutura da molécula, através da perda de 99 Da (Fig. 29).

Figura 29. Experimento MS^5 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 703. De acordo com a fragmentação obteve-se o íon produto de m/z 605.

O experimento de MS^3 a partir do íon de m/z 694, observou-se a formação do íon produto de m/z 595, o que permite inferir a existência de uma unidade de valina na estrutura em questão (Fig. 30)

Figura 30. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 1045. De acordo com a fragmentação por CID obteve-se o seguinte íon produto de m/z 694.

O experimento de MS^4 a partir do íon de m/z 595 resultou na formação do íon de m/z 481, indicando a perda sequencial de uma unidade de leucina, através da perda de 113 Da (Fig. 31).

Figura 31. Experimento MS⁴ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 694. De acordo com a fragmentação por CID obteve-se o seguinte íon produto de m/z 595.

O experimento de MS⁵ do íon de m/z 481, resultou na perda de 115 Da, indicando assim a perda consecutiva de uma unidade de aspartato nesta molécula (Fig. 32).

Figura 32. Experimento MS⁵ realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon m/z 594. De acordo com a fragmentação obteve-se íon produto de m/z 481 e 463.

Experimentos adicionais envolvendo o íon de m/z 366, permitiram corroborar com a estrutura abaixo proposta para este heptapeptídeo (**4**) (Tabela 2).

5.4.2.4. Isômero íon m/z 1045

No outro isômero de m/z 1045, conforme demonstrado através do cromatograma (Fig.33), observou-se também a mesma sequência peptídica de Leu/Ile-Leu-Asp-Val na primeira via de

fragmentação, através dos fragmentos de m/z 932, 801 e 604, respectivamente. Diferentemente da molécula anterior, esta possui o fragmento de m/z 708, o qual refere-se à perda da cadeia de ácido graxo associada uma unidade de glutamato. O experimento de MS³ a partir deste fragmento, apresentou os fragmentos de m/z 594, 481 e 463 (referente a segunda via de fragmentação), os quais correspondem à perda de uma leucina/isoleucina, seguida de outra leucina/isoleucina e uma molécula de água, respectivamente. Estes dados permitem indicar a presença de outra surfactina (**3**) (Tabela 2).

Figura 33. Full MS² ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon isômero de m/z 1045. Em azul fragmentação da primeira via do anel lactona e em rosa a segunda via de fragmentação.

Tabela 2: Estruturas dos lipopeptídios cíclicos obtidos por ESI-CID/MS

Massa (<i>m/z</i>)	Nome	Atribuição	Estrutura
1059	Surfactina (1)	C ₁₅ [M+Na] ⁺	$\begin{array}{c} R_n\text{-CH-CH}_2\text{-CO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu/Ile} \\ \\ \text{O} \end{array}$
1031	Surfactina (2)	C ₁₃ [M+Na] ⁺	$\begin{array}{c} R_n\text{-CH-CH}_2\text{-CO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu/Ile} \\ \\ \text{O} \end{array}$
1045	Surfactina (3)	C ₁₄ [M+Na] ⁺	$\begin{array}{c} R_n\text{-CH-CH}_2\text{-CO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu/Ile} \\ \\ \text{O} \end{array}$
1045	Nova Estrutura (4)	C ₁₆ [M+Na] ⁺	$\begin{array}{c} R_n\text{-CH-CH}_2\text{-CO-Val-Leu-Asp-Val-Asp-Leu-Leu/Ile} \\ \\ \text{O} \end{array}$

5.5. Análises Cromatográficas das Frações

5.5.1. Fração Sephadex 1

O fracionamento em coluna de permeação da FrOrg de *B. velezensis* resultou em 4 grupos de frações. A análise por UPLC-ESI-IT-MS da fração oriunda da FrSph1 resultou na separação e detecção de pelo menos, 11 metabólitos secundários nesta mistura (Fig.34). Sendo os mais intensos os picos 1045 e seus isômeros e o pico 1059.

Figura 34. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph1 do precipitado de *B. velezensis*.

5.5.2. Fração Sephadex 2

A análise por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph2 de *B. velezensis* resultou na separação pelo menos, 5 picos nesta mistura (Fig.35), dos quais os de m/z 1080, 1066 e 1094 são os mais intensos.

Figura 35. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph2 do precipitado de *B. velezensis*.

5.5.3. Fração Sephadex 3

A análise por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph3 de *B. velezensis* resultou na separação com

presença de pelo menos, 3 picos nesta mistura (Fig.36).

Figura 36. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph3 do precipitado de *B. velezensis*.

5.5.4. Fração Sephadex 4

A análise por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph4 de *B. velezensis* resultou na separação de pelo menos 6 picos nesta mistura (Fig. 37).

Figura 37. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph 4 do precipitado de *B. velezensis*.

5.6. Ensaio de Difusão em Ágar com os grupos de frações

O ensaio de difusão em ágar com os quatro grupos de frações obtidos da Sephadex revelou que FrSph 1 apresentou atividade antifúngica contra a maioria dos fungos fitopatogênicos. Apenas, contra o fungo *A. flavus* (Fig. 38 A) não houve uma atividade direta. Entretanto, FrSph 2 também apresentou atividade contra a maioria dos fungos de estudo, somente não é visível a atividade contra *M. pernicioso* (Fig. 38 C). Já os grupos de frações 3 e 4, não apresentaram nenhum tipo de atividade antifúngica.

Figura 38. Ensaio de difusão em disco com as frações (1) -FrSph1, 2- (FrSph2), 3- (FrSph3), 4- (FrSph4) e C – (Controle DMSO) contra os fungos fitopatogênicos (A) *Aspergillus flavus*, (B) *Bothrytis* sp., (C) *M. pernicioso*, (D) *Fusarium graminearum*, (E) *F. oxysporum*, (F) *F. verticillioides* e (G) *T. reesei* e desenho do esquema da placa com os discos contendo as frações. Aliquotou-se 10 µL (1mg mL⁻¹) de cada fração em discos de papéis estéreis e aplicou-se sobre PDA. No centro da placa aplicou-se 10⁴ conídios/mL dos fungos fitopatogênicos e incubou-se por 4 dias a 25° C ± 2.

6. DISCUSSÃO

O estudo das atividades antagonísticas e dos metabólitos secundários produzidos pelas bactérias do gênero *Bacillus* tem sido bastante descrito na literatura (BENITEZ et al., 2012; FIGUEROA-LÓPEZ et al., 2014; LYNGWI & JOSHI 2014; YAN et al., 2012). Os estudos com a bactéria *B. velezensis*, descrita neste trabalho, iniciou-se devido a esta ter sido encontrada em uma placa do fungo *T. reesei* QM9414, onde formou um halo de inibição do crescimento fúngico. Isso levou à busca pela molécula inibitória e à identificação da espécie da bactéria.

Para identificação molecular e filogenética de espécies de bactérias do gênero *Bacillus* e de outras bacterianas utiliza-se uma região bastante descrita na literatura para este objetivo, e esta é a região 16S rDNA. Esta é bastante usada por ser uma região bastante conservada, de maneira a propiciar a detecção de possíveis relações entre espécies distantes (WOESE & FOX, 1977; WISOTZJSEY et al., 1992). As análises da região 16S rDNA permitiu reconstruir uma árvore filogenética na qual a bactéria de estudo encontra-se no mesmo clado da espécie *B. velezensis* (Fig. 4). Embora o suporte (valor de bootstrap) não esteja próximo de 100%, mas de 68%, este é um valor considerável, dada as características conservadoras da análise de confiança gerada pelo bootstrap não-paramétrico.

Vários estudos mostram as potencialidades dos metabólitos secundários obtidos através do extrato bruto de bactérias do gênero *Bacillus*. Tais extratos apresentaram grande potencial inibitório quando testados contra vários outros micro-organismos, apresentando alta atividade antimicrobiana (SCHULTZ, 2003), antifúngica (WONG et al., 2008, WONG et al., 2009) entre outras. Desta forma, ensaios foram realizados para analisar o efeito inibitório dos metabólitos secretados pela bactéria *B. velezensis* isolada em nosso laboratório sobre o crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos.

Verificou-se o efeito inibitório dos metabólitos secretados pela cepa bacteriana sobre o crescimento de *T. reesei* QM9414. Os resultados demonstraram o potencial inibitório que o metabólito secretado por *B. velezensis* apresentou contra tal fungo (Fig. 5). Na literatura, há estudos de inibição onde este fungo filamentoso é escolhido para este tipo de análise. Fuentes (2004) indicou que proteínas tais como Canacistatina RZ2001 obtida de cana-de-açúcar e a proteína cistatina de painço obtida de *Pennisetum glaucum*, em pequenas quantidades, causam inibição em fungos filamentosos fitopatogênicos e não patogênicos como *T. reesei*.

Mediante os resultados obtidos com o ensaio *in vitro* contra *T. reesei*, foram testadas as atividades frente aos fungos fitopatogênicos *A. flavus*, *Bothrytis* sp., *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* e *M. perniciosus*. Os resultados permitiram confirmar que os metabólitos produzidos por *B. velezensis* também apresentam atividade inibitória contra estes fungos (Fig. 6). De acordo com a literatura, a eficiência de inibição de fungos por meio de extratos brutos, se deve à presença de lipopeptídeos e proteínas encontradas em espécies como *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B.*

megaterium, *B. cereus* entre outras espécies deste gênero bacteriano. Atividade antifúngica por intermédio de espécies do gênero *Bacillus* é descrita no trabalho de FIGUEROA-LÓPEZ e colaboradores (2016) que realizaram um estudo com várias espécies de *Bacillus* contra o fungo *F. verticillioides*. No trabalho de CHEN e colaboradores (2008) a atividade antagonística entre *B. subtilis* frente aos fungos *F. graminearum*, *B. cinerea*, *A. flavus* é descrita, assim como no trabalho de BENITEZ e colaboradores (2012) mostra a inibição no desenvolvimento dos fungos *F. oxysporum* e *F. graminearum*, *A. flavus* ATCC 16404 pela espécie *B. amyloliquefaciens* LBM 5006. Estas ações observadas permitiram sugerir que os lipopeptídeos produzidos por bactérias deste gênero, poderiam ser uma alternativa na substituição de agrotóxicos, pois apresentaram potencial para o tratamento das lavouras de modo similar ao dos defensivos agrícolas empregados. Estas espécies anteriormente citadas, são consideradas não toxigênicas e seguras para serem utilizadas na agricultura, como tratamentos para humanos e para propósitos veterinários. Alguns estudos já mostraram compostos bioativos obtidos a partir deste tipo de micro-organismo (BENITEZ et al., 2012; JEMIL et al., 2017; SCHULZ et al., 2005).

Dos meios de culturas empregados neste estudo, o caldo BD se mostrou o mais efetivo para uma maior produção de metabólitos secundários. A composição deste meio por apresentar diferentes fontes de carbono como dextrose e o amido, contido na batata, podem ter colaborado para esta maior produção, além do custo para produção deste caldo ser mais barato do que os outros meios de cultura. SALAMONI, GERMANI, VAN DER SAND (2012) observaram uma maior produção da biomassa e metabólitos por *Streptomyces* ao usarem um meio de cultura contendo extrato de malte e glicose, que são fontes de carbono. No trabalho descrito por YULIAR (2005), a adição de ácido palmítico no meio de cultura melhorou a produção de iturina por *B. subtilis* RB14-CS. Mostrando assim que os componentes do meio de cultura e a adição de nutrientes podem influenciar na quantidade e variedade de metabólitos a serem produzidos pelas bactérias.

Além da questão da composição do meio de cultura, a literatura também descreve que os metabólitos secundários produzidos por bactérias como os antibióticos, lipopeptídios, toxinas, pigmentos, sideróforos entre outros são produzidos no fim da fase logarítmica e/ou no meio da fase estacionária, em específico a idiofase, no momento da exaustão de nutrientes, em condições estressantes propiciada pelo ambiente, além de limitação do crescimento bacteriano. E estes metabólitos são produzidos como forma de proporcionar condições para sobrevivência da bactéria (GOKULAN, K. et al., 2014). Assim, compreende-se também, que os metabólitos produzidos por *B. velezensis*, mediante o tempo de inoculação extenso, foram produzidos por intermédio de uma condição de sobrevivência diante de um ambiente com exaustão de nutrientes do meio de cultura escolhido em um determinado momento e em uma condição que não favorecia o desenvolvimento bacteriano.

Em função da atividade antagonística observada nos ensaios *in vitro* contra os fungos fitopatogênicos, partiu-se para as análises de identificação e caracterização estrutural dos metabólitos secundários secretados. Neste sentido, foram realizadas análises por CCD e CCDP, as quais permitiram

obter a fração FrOrg. Após análises realizadas por LC-ESI-MS/MS, revelaram que esta se tratava de uma mistura de pelo menos 6 metabólitos secundários, com m/z 1059, 1045, 1031 e 1093 sendo que os metabólitos de m/z 1059 e 1045 apresentaram isômeros após a purificação (Fig. 12). De acordo com a literatura, os extratos metanólicos de *B. megaterium* apresentaram a presença de isômeros, além da confirmação de moléculas oriundas da família da surfactina com massas similares as apresentadas (MA et al., 2016; PECCI et al.; 2010).

Vários experimentos de ESI-MSⁿ foram realizados a partir dos íons de m/z 1030, 1045 e 1059 da FrOrg. Os experimentos realizados para o íon $[M+Na]^+$ de m/z 1059 permitiu visualizar duas vias diferentes de fragmentação a partir deste íon (Fig. 16 a 22). Para a primeira via, foram observados os fragmentos de m/z 1059, 1041, 946, 833, 718 e 619, os quais correspondem à perda sequencial de H₂O, Leu/Ile, Leu/Ile, Asp e Val, respectivamente. Já a segunda via de fragmentação, se dá pela perda inicial da cadeia carbônica do ácido graxo β -hidroxílico (C₁₅) associado à uma unidade de glutamato, fornecendo o íon de m/z 708 (Fig. 16). Este íon por sua vez, gera os íons de m/z 595, 481 e 463, através da perda sequencial de Leu/Ile, Leu/Ile e H₂O. Estes tipos de fragmentações foram descritos previamente por JEMIL et al. (2017) e PECCI et al. (2010), os quais mostraram a abertura da estrutura cíclica contida na molécula e as perdas sequenciais dos aminoácidos referentes à cada porção desta abertura. Os nossos resultados referentes aos fragmentos de cada via da abertura da molécula, estão de acordo com aqueles reportados por estes autores. Logo, estes dados nos permitem indicar que esta molécula corresponde a uma surfactina (Tabela 2. Fig. 1) previamente identificada no extrato de *Bacillus megaterium* (MA et al., 2016), *B. subtilis* C-1 (VALTER et al., 2002; HADDAD et al., 2008) e *B. amyloliquefaciens* (YAN et al., 2012; ZOUARI et al., 2016) que foram identificadas por LC-ESI/MS.

De modo análogo à molécula descrita anteriormente, realizou-se experimentos para o íon $[M+Na]^+$ de m/z 1031. Foi observado um mesmo padrão de fragmentação visto para o íon de m/z 1059. Na primeira via de fragmentação foram observados os seguintes fragmentos de m/z 918, 805, 787, 689, 672 e 590, os quais indicam a perda sequencial dos aminoácidos Leu/Ile-Leu/Ile-H₂O-Asp-H₂O-Val (Fig. 23, 24 e 25). Já na segunda via de fragmentação apresentada na figura 23, observa-se a perda da cadeia do ácido graxo β -hidroxílico (C₁₃), com a presença adicional de uma unidade de glutamato. A partir deste último fragmento, observou-se as perdas dos aminoácidos Leu/Ile-Leu/Ile. Logo, tais dados também permitem inferir que esta cadeia de ácido graxo β -hidroxílico está associada a uma cadeia heptapeptídica cíclica, assim indicando mais uma molécula de surfactina (2). Esta molécula foi também anteriormente descrita por JEMIL et al. (2017) para o *B. methylotrophicus* DCS1 o qual também apresentou moléculas da família da iturina e fengicina o que é característico deste gênero bacteriano. Além de este padrão de fragmentação da molécula de surfactina (2) também ter sido descrito por CHEN et al. (2008) para a espécie *B. subtilis* e PECCI et al. (2010) em seus trabalhos.

As análises por UPLC-ESI-IT-MS da FrOrg de *B. velezensis* revelou a presença de mais de um composto com m/z 1045 (Fig. 12 e 13). Através dos experimentos de MSⁿ foi possível caracterizar a

fragmentação de dois isômeros. De modo análogo aos íons de m/z 1031 e 1059, um dos íons de m/z 1045 também apresenta uma similar abertura na estrutura da molécula, permitindo inferir que a mesma é um lipopeptídeo. Na primeira via de fragmentação a partir do íon precursor de m/z 1045, foram observados os íons de m/z 932, 801 e 604 (Fig.33) que se referem às perdas consecutivas de Leu/Ile-Leu/Ile-Asp-Val. Já na segunda via, foram observados os fragmentos dos íons de m/z 708, 595, 481 e 463, os quais referem-se à perda de uma Leu/Ile-Leu/Ile-H₂O, respectivamente (Fig. 33) permitindo inferir que tal molécula trata-se de uma surfactina (**3**). Contudo, a cadeia de ácido graxo do tipo β -hidroxílico para este íon é uma cadeia de catorze carbonos (C₁₄), o qual foi descrita no também trabalho de JEMIL et al. (2017) para a surfactina produzida pelo *B. methylotrophicus* DCS1.

No isômero de m/z 1045, observou-se também as duas vias de fragmentação (Fig. 26 a 32). Na primeira via foram observados os fragmentos de m/z 932, 819, 703 e 605, os quais correspondem às perdas de uma Leu/Ile-Leu/Ile-Asp-Val, respectivamente. Na segunda via de fragmentação foram visualizados os íons de m/z 693, 594, 481 e 366, os quais correspondem às perdas dos aminoácidos Val-Leu/Ile-Asp. As análises destes dados permitem sugerir que a molécula possui uma cadeia de ácido graxo de C₁₆. As estruturas apresentadas na literatura para a família da surfactina, apresentam sempre o glutamato como sendo o primeiro aminoácido ligado à cadeia do ácido graxo, o que não é observado para o metabólito em questão, pois este inicia-se com uma unidade de Valina. A unidade de glutamato diretamente ligada à cadeia de ácido graxo, é considerada como sendo um resíduo na composição de moléculas pertencentes a esta família de lipopeptídeos, além da variação entre outros aminoácidos na quarta e sétima posição da estrutura cíclica da molécula de surfactina (BONMATIN et al., 2003; JEMIL et al., 2017). Comparando esta estrutura deste metabólito secundário com as outras pertencentes às famílias de iturina e fengicina, foi possível constatar que não houve similaridade no sequenciamento dos aminoácidos com aquelas já descritas anteriormente (BONMATIN et al., 2003; MA et al. 2016). Um criterioso levantamento bibliográfico utilizando-se a base de dados Scifinder (<https://scifinder-cas.ez67.periodicos.capes.gov.br/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>), indicou que a estrutura da molécula lipopeptídica de m/z 1045 (**4**) obtida de *B. velezensis* não foi descrita até o dado momento.

Os ensaios biológicos com as frações obtidas através do fracionamento em coluna de permeação em gel do precipitado mostraram que as frações 1 (FrSph 1) e 2 (FrSph 2) apresentaram atividade antifúngica. Entretanto, as amostras 3 (FrSph 3) e 4 (FrSph 4) foram inativas. As análises dos dados obtidos por UPLC-ESI-MS e ESI-MSⁿ mostraram que o perfil cromatográfico de FrSph 1 é bastante diferente dos cromatogramas das frações FrSph 2, FrSph 3 e FrSph 4. A presença dos íons de m/z 1031, 1045 e 1059 indicam a presença das moléculas de surfactinas (**1**, **2** e **3**) e a nova molécula (**4**), juntamente com outros picos minoritários de m/z 1066, 1080 e 1094. Como estes metabólitos diferem entre si de 14 Da, e apresentam m/z de moléculas da família da iturina ocorrentes em *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*, é possível sugerir que também sejam compostos pertencentes à mesma família (PATHAK et al., 2014; PECCI et al., 2010; ROMERO et al. 2007).

Analisando-se o cromatograma da FrSph2, observou-se um perfil químico similar, porém com a inversão da quantidade destes metabólitos, sendo mais proeminentes os derivados da família da iturina do que os da surfactina de m/z 1045 e 1059, os quais foram identificados neste trabalho.

Já os perfis cromatográficos das frações FrSph 3 e FrSph4 mostraram que estas detinham os derivados da família da iturina e não mostraram ação antifúngica. Desta maneira, sugere-se que a presença das surfactinas (**1**, **2**, **3**) e a nova molécula (**4**) na FrSph1 e na FrSph 2 promovem a ação antifúngica.

Segundo MAGET-DANA et al. (1992) existe um efeito sinérgico entre a surfactina e a iturina, de forma que a surfactina aumenta a atividade antibiótica da iturina. Em seu trabalho MAGET-DANA et al. (1992) também infere que o caráter de surfactante que a surfactina apresenta colabora de tal forma que a iturina alcance e perturbe a membrana das células alvo. E, além disto, que a produção deste dois lipopeptídios funcionando como um complexo que provavelmente estejam envolvidos na regulação do crescimento da bactéria que a produz.

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu concluir que:

1. Análise filogenética da região 16S rDNA permitiu identificar a bactéria deste estudo como *Bacillus velezensis*;
2. Os ensaios antagonísticos entre a bactéria *B. velezensis* e os fungos filamentosos *T. reesei* QM9414, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *A. flavus* e *Bothrytis sp.* mostraram a potencialidade existente nos metabólitos produzidos pela bactéria para inibir o crescimento dos fungos em placa;
3. Análises realizadas por meio de CCD e CCDP permitiram a obtenção de uma fração de metabólitos a qual, após análise por UPLC-ESI-IT-MS, permitiu-se identificar que a fração se tratava de uma mistura de metabólitos;
4. Por intermédio de estudos realizados através de ESI-CID/MS concomitantemente com dados da literatura permitiram realizar a caracterização das estruturas de 04 moléculas obtidas de *B. velezensis*, onde uma delas ainda não foi descrita na literatura.
5. Separação por cromatografia de permeação em gel permitiu obter quatro grupos de frações FrSph 1, FrSph 2, FrSph 3 e FrSph 4.
6. As análises por UPLC-ESI-IT/MS das frações revelaram que a FrSph 1 apresentou um perfil cromatográfico diferente dos outros, por conter as moléculas de surfactinas que foram caracterizadas neste estudo, assim como a molécula nova, além dos íons de m/z 1066, 1080 e 1094, os quais podem pertencer à família da iturina.
7. As amostras FrSph 2, FrSph 3 e FrSph 4 apresentaram um perfil bastante semelhante, também apresentando os íons de m/z 1066, 1080 e 1094 oriundos da família da iturina, todavia, a amostra FrSph 2 contém pequenos picos referentes aos íons de m/z 1045 e 1059 que são da família da surfactina.
8. O ensaio de difusão em disco permitiu constatar que a fração FrSph 1 apresenta atividade antifúngica contra a maioria dos os fungos fitopatogênicos estudados neste trabalho, exceto contra o fungo *A. flavus*.
9. A fração FrSph 2 também apresentou atividade, mas não contra todos os fungos e isto também pode ser porque nesta fração a quantidade de surfactina é baixa, logo não potencializando sua ação contra todos os fungos.

- 10.** Os metabólitos secundários encontrados neste estudo, tanto os já descritos na literatura quanto o novo, apresentam potencial para tornar-se um controle biológico contra os fungos fitopatogênicos aqui estudados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ADAPAR – Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=335>> Acesso em 26/01/2016
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. **Basic local alignment search tool**. *Journal Molecular Biology*, 1990. v.215, nº3, p. 403-410.
- ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; PRÍNCIPE, A.; BORIOLO, G.; FISCHER, S.; MORI, G.; JOFRE, E. **The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strain MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease**. *Journal of Applied Microbiology*, 2011. v. 112, p.159-174.
- AYED, H. B.; HMIDET, N.; BÉCHET, M.; CHOLLET, M.; CHATEIGNÉ, G.; LECLÈRE, V.; JACQUES, P.; NASRI, M. **Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21**, *Process Biochemistry*. v.49, p. 2014.
- BARROS, J. R. M. de. **A Indústria e o Agronegócio Brasileiro**. Disponível em <https://iedi.org.br/media/site/artigos/20180703-a_industria_e_o_agronegocio_brasileiro.pdf> Acesso em: 20/11/2018
- BEISSWENGER, C., HESS, C. E BALS, R. ***Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon- γ signaling in respiratory epithelial cells**. *European Respiratory Journal*, 2012. v. 39, p. 411–418.
- BENITEZ, B. L.; VELHO, R. V.; LISBOA, M. P.; MEDINA, L. F. da C.; BRANDELLI, A. **Isolation and Characterization of Antifungal Peptides Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006**. *The Journal of Microbiology*, 2010. vol. 48, nº6, p. 791-797
- BENITEZ, L. B. **Caracterização de peptídeos antimicrobianos de *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade antibacteriana, antifúngica e amebicida**. 2010. 169 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.
- BENITEZ, L. B.; VELHO, R. V., MOTTA, A. S., SEGALIN, J., BRANDELLI, A. **Antimicrobial factor from *Bacillus amyloliquefaciens* inhibits *Paenibacillus* larvae, the causative agent of american foulbrood**. *Arch Microbiol*. 2012, nº. 194, p. 177-185.
- BOMBARDI, L. M. **Intoxicação e morte por defensivos agrícolas no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado**. *Boletim Data Luta*, 2011. v. 45, p. 1-21.
- BONMATIN, J-M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. **Diversity Among Microbial Cyclic Lipopeptides: Iturins and Surfactins. Activity-Structure Relationships to Design New Bioactive Agents**. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2003. vol.6, nº6, p. 541-556.

- BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. **Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides.** Process Biochemistry, New York, vol. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.
- CALTAGIRONE, L. E. **Definitions and Principles of Biological Control.** In. **2nd International Short Course in Biological Control**, Berkeley, 1988.
- CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia e meio ambiente.** Viçosa: Folha de Viçosa, 2004. p. 309-350.
- CARALLO, E. M. & FILHO, H. P. S. **Manual Básico de Técnicas Fitopatológicas: Laboratório de Fitopatologia Embrapa Mandioca e Fruticultura.** Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2016. 1^o ed., p.109.
- CAXIETA, F. **Expressões diferencial de genes nas interações entre sementes de milho e *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium* spp.** 2012. 104f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotécnica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/restrito/lerNoticia.asp?id=2085>> Acesso em: 18/11/2018
- CHEN, H.; WANG, L.; SU, C.X.; GONG, G.H.; WANG, P.; YU, Z.L. **Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*.** Letters in Applied Microbiology. 2008, vol.47, p. 180-186.
- CONNELL, J. H. **On the prevalence and relative importance of interspecific competition: Evidence from field experiments.** The American Naturalist, 1983. vol. 122, n° 5, p. 691-696.
- CORRÊA, ÉLIDA BARBOSA. **Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) em cultivos hidropônicos.** 2009. 133f. Tese (Doutorado em Ciências Agrônomicas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2009.
- CORTÉS, J. A. L. & RUSSI, J. A. N. **Echinocandins.** Revista Chilena de Infectología, 2011. vol. 28, n° 6, p. 529-536.
- DARWICHE, R.; ATAB, O. E.; BARONI, R. M.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; MONDEGO, J. M. C.; PEREIRA, G. A. G.; SCHEITER, R. **Plant pathogenesis-related proteins of the cacao fungal *Moniliophthora perniciosa* differ in their lipid-binding specificities.** Journal Biological Chemistry. 2017, vol. 292, n° 50, p. 20558-20569.
- DEAN, R. A.; LICHENS-PARK, A.; KOLE, C. *Fusarium oxysporum*. In: DEAN, R. A., LICHENS-PARK, A., KOLE, C. (Eds.) **Genomics of Plant-Associates Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens.** : Springer- Verlag Berlin Heidelberg, 2014. p. 99-119.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. **The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology**. Molecular Plant Pathology, 2012. v. 13, p.414 – 430

DEBACH, P. **Biological Control of Insect Pests and Weeds**. New York, Reinhold, 1964. p. 844

DEBACH, P.& ROSEN, D. 1991. **Biological control by natural enemies**. University Press, Cambridge. 440p.

DEITHIER, V.G. **Evolution of feeding preferences in phytophagous insects**. Evolution, 1954. vol. 8., p. 33-54.

DEMAIN, L. A. & FANG, A. The Natural Functions of Secondary Metabolites In: DEMAIN, L. A. & FANG, A. **History of Modern Biotechnology I**. Springer Berlin Heidelberg, 2000. vol. 69, p.1-39. (Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology)

DIAS, P. P. **Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas**. 2011. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal rural do Rio de Janeiro –Instituto de Agronomia, Rio de Janeiro, 2011.

DIKSHIT, A.; MISHARA, B. K.; MISHRA, R. K; MISHRA, R.C.; TIWAEI, A. K.; YADAV, R.S.; **Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L.** Archives of Applied Science Research, 2011. vol. 3, n° 2. p. 361-369.

DUNLAP, C. A.; KIM, S. J.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. ***Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics**. International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016. vol. 66, n°3, p. 1212-1217.

EMPRAPIA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Técnicas de Produção de Soja Região Central do Brasil. 2004. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br/producao soja/rotacao.htm>> Acesso em 13/11/2015.

EUZEBY, J. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**, 1997 - Genus *Bacillus*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/bacillus.html>. Acesso em 04/06/2018.

EWING, B. & GREEN, P. **Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities**. Genome Research, 1998. vol. 8, n° 3, p. 186-194

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. **Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment**. Genoma Research, 1998. vol.8, n°3, p. 175-185.

FIGUEROA-LÓPEZ, A. M.; CORDERO-RAMÍREZ, J. D.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. C.; LÓPEZ-MEYER, M.; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G. J.; FÉLIX-GASTÉLUM, R.; CASTRO-MARTÍNEZ, C.; MALDONADO-MENDOZA, E. **Rizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides***. SpringerPlus, 2016. v. 5, p. 330-342.

FILHO, A. B. & da SILVA, E. M. **Observações sobre o parasitismo de *Neodusmetia sangwani* sobre a cochonilha (*Antonina graminis*)**. Pesquisa agropecuária Brasileira, 1988. vol. 23, nº3, p. 329-331.

FILHO, B. E. & CIOCIOLA, A. I. Parasitóides ou predadores? Vantagens e Desvantagens. In: BENTO, J. M. S.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; PARRA, J. R. P. Ed(s). **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Manole Ltda, 2002. p. 29-41

FILLIPI, D. **Ação antifúngica do extrato de *Physalis peruviana* Linnaeus frente ao fungo *Bothrytis cinerea***. 2018, 86f. Dissertação (Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

FORMIGHIERI, E. F. **Genoma de *Moniliophthora perniciosa*: montagem e anotação da mitocôndria e desenvolvimento de sistema de anotação semi-automático de genes**. 2006.172f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia, Campinas, 2006.

FRAENKEL, G.S. **The raison s'être of secondary plant substances**. Science, 1959. vol. 129, p. 1466-1470.

FUENTE, A. S. da C. **Expressão Heteróloga, Purificação e Estudos de Atividades de uma proteína inibidora de cisteíno protease da cana-de-açúcar e posterior evolução in vitro pela técnica de DNA Shuffling**. 2004.101 f. Tese (Doutorado em Genética Molecular na área de Bioquímica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2004.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, RP.L.; BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1978, p. 531

GARRIGUES, S.; GANDÍA, M.; MARCOS, J. F. **Occurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum***. Applied Microbiology Biotechnology, 2016. vol.100, p. 2243-2256.

GOKULAN, K.; KHARE, S.; CERNIGLIA, C. Metabolic Pathways: Production of Secondary metabolites of Bacteria. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (Eds.) **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2º ed. Elsevier Ltda, Academic Press, 2014, p. 561-569. Disponível em :<https://www.researchgate.net/publication/288178246_Metabolic_Pathways_Production_of_Secondary_Metabolites_of_Bacteria> Acesso em: 28/11/2018.

GÓMEZ, B.L. **Histoplasmosis: Epidemiology in Latin America**. Current Fungal Infections Reports, 2011. vol. 5, nº4, p. 199-205.

GONÇALVEZ, L. **Fatos Históricos do Controle Biológico**. Floresta e Ambiente, 1996. ano 3, p.96-101.

GORDON, D. Viewing and editing assembled sequences using Consed. In: BAXEVANIS, A. D.; DAVISON, D. B. Ed(s). **Current Protocols in Bioinformatics**. New York: John Wiley & Co, 2004, 11.2.1 – 11.2.43.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. **Consed: a graphical tool for sequence finishing**. Genome Research,

1998. vol.8, n °3, p. 195-202.

GORDON, D.; DESMARAIS, C.; GREEN, P. **Automated finishing with Autofinish**. Genome Research, 2001. vol. 11, p. 614-62.

GRABKE, A. **Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry – Molecular Mechanisms and Management**. 2014, 106 f. Tese (Ciências Agrônômicas e de Cultivos comuns, Biologia comum e Patologias Farmacêutica), Universidade de Clemson, Carolina do Sul, 2014.

GRAVENA, S. **Controle Biológico no Manejo Integrado de Pragas**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1992, vol.27, p. 281-299.

HADDAD, N. I. A.; LIU, X.; YANG, S.; MU, B. **Surfactin Isoforms from *Bacillus subtilis* HSO121: Separation and Characterization**. Protein & Peptide Letters. 2008, vol. 15, p. 265-269.

HO, V.S., WONG, J.H., NG, T.B. **A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana**. Peptides, 2007. n° 28, p. 760–766.

HOPWOOD, K A. & SHERMAN, D.H. **Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis**. Annual Review of Genetics, 1990. vol.24., p. 37-66.

HUFFAKER, C. B. & MESSENGER, P. S. **Theory and Practice of Biological Control**. Califórnia: *Academic Press*, 1976, p. 788.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Consumo de defensivos agrícolas no Brasil** Disponível em: Acesso em 11/12/2017

JEMIL, N.; MANRESA, A.; RANAL, F.; AYED, H. B.; HMMIDET, N.; NASRI, M. **Structural characterization and Identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain**. Journal of Chromatography B, 2017. vol. 1060, p. 374-386

KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento. **Agrotécnica**, v.1, p.5-7. 1987

KIMATI, H. Controle Químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. vol.1, p. 761-785.

KIMURA, M. **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotides sequences**. Journal Molecular Evolution, 1980. vol.16, n°2, p. 111-120.

KNOGGE, W. **Fungal infection of plants**. The Plant Cell, 1996. vol. 8, p.1711-1722.

KUMAR, S.; STENCHER, G.; TAMURA, K. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets.

LIMA, MIRTES FREITAS. "Diagnóstico de doenças em plantas e frutos de mangueira no Submédio do Vale do São Francisco." *Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: **O AGRONEGÓCIO manga:**

produção e mercado. Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2002.

LYNGWI, N. A. & JOSHI, S. R. Economically important *Bacillus* and related genera: a mini review. In: SEN, A. (Ed.) **Biology of useful plants and microbes.** New Delhi, India: Narosa Publishing House, 2014. cap. 3, p. 33-43

MA, Y.; KONG, Q.; Qin, C.; CHEN, Y.; LV, R.; ZHOU, G. **Identification of lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultratration and LC-ESI-MS/MS.** AMB Express, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Micro-organismos e Microbiologia. In:_____. **Microbiologia de Brock.** Tradução: MARANHÃO, A. Q.; de LIMA, B. D.; KYAW, C. M. Porto Alegre: *Artmed*, 2010. 12 ed., p.34, 40.

MAGET-DANA, R. & PTAK, M. **Iturin lipopeptide: interaction of mycosubtilin with lipids in planar membranes and mixed monolayers.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1990. vol. 1023, p. 34-40.

MAGET-DANA, R.; THIMON, L. PTAK, M. **Surfactin/Iturin A interaction may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A.** Biochime, 1992. vol.74, p. 1047-1051.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Mundial e Brasil até 2016/2017.** Disponível em <http://www.agroprecisa.com.br/site/noticias/download/Agronegocio_10anos.pdf> Acesso em: 20/11/2018

MERCK, Dyeing **Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography.** E. Merck, Darmstadt, 1971. p. 118

MNIF, I. & GHRIBI, D. **Lipopeptides Biosurfactants: Mean Classes and New Insights for Industrial, Biomedical, and Environmental Applications.** Biopolymers (Peptide Science), 2015. vol. 104, nº 3, p. 129-143.

MONGKOLTHANARUK, W. **Classification of *Bacillus* Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals.** Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012. vol. 22, nº 12, p. 1597-1604.

MORANDI, M. A. B. & BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: MORANDI, M. A. B. & BETTIOL, W. Ed(s). **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas.** Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2009. 1ªed., p. 7-14.

MORANDI, M. A. B.; JÚNIOR, T. J. de P.; BETTIOL, W.; TEIXEIRA, H. Controle Biológico de Fungos Fitopatogênicos. In: Lacerda, V. Ed. **Informe Agropecuário: Controle Biológico de Pragas, Doenças e Plantas Invasoras.** Minas Gerais: EPAMIG, 2009. vol.30, nº 251, p.73 – 81.

MORRIS, M. I. & VILLMANN, M. **Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1.** American Journal of Health-System Pharmacy, 2006. vol. 63, p. 1693-1703

NUNES, W. Manejo de fungos do solo na cultura do feijão irrigado. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. (Ed.) **Feijão Irrigado: Tecnologia e produtividade.** Piracicaba: ESALQ, 2003. p. 127-151.

OLIVEIRA M. A.; MARACUJÁ P. B.; FILHO, E. T.D.; LINHARES, P. C. F. **Controle Biológico de Pragas em Cultivo Comerciais como Alternativa ao uso de Agravicidas**. Revista Verde de Agroecologia e desenvolvimento Sustentável, 2006. Vol. 1, n°. 2; p. 1-9

ONGENA, M.; JACQUES, P.; TOURÉ, Y.; DESTAIN, J.; JABRANE, A.; THONART, P. **Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis***. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005. vol. 69, p. 29-38.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO.J.M.S. Controle Biológico: Terminologia. In:_____. Ed(s). **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Manole Ltda, 2002, p. 1-14.

PATHAK, K. V. & KEHARIA, H. **Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry**. 3 Biotech, 2014. vol. 4, p. 283-295.

PECCI, Y.; RIVARDO, F.; MARTINOTTI, M. G.; ALLEGRONE, G. **LC/ESI-MS/MS characterization of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain**. Journal of Mass Spectrometry, 2010. v.45, p.772-778.

PELCZAR Jr, M.J.; CHAN, E.C.S. e KRIEG, N.R. **Microbiologia**, vol. II, 2a ed. - São Paulo: Makron Books, 1996.

PETRY, G.L. **Atividade fitotóxica de extratos e exsudatos radiculares de *Guilandina bonduc* (Fabaceae)**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Protocolo JGI para extração de DNA genômico de bactéria. Disponível em: <http://jgi.doe.gov/wp-content/uploads/2014/02/JGI-Bacterial-DNA-isolation-CTAB-Protocol-2012.pdf>. Acesso em 13/04/2017.

RAMOS, D. P.; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, B. G. T. L.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R. D. **Infecções por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho**. Revista Agropecuária Tropical, 2014. v. 44, n.1, p.24-31.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 1996., p. 748.

RAW, I; MENNUNCI L.; KRASILCHIK, M. A **Biologia e o Homem**, vol. 4 - São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo (EDUSP), 2001.

RELATÓRIO PARA A ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA OS DIREITOS HUMANOS (OHCHR) 2017.Disponível em: <http://agripa.org/download-doc/137213>. Acesso em: 28/04/2017.

RELATÓRIO PARA ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO (FAO) 2015. Diponível em: <http://www.agri-outlook.org>. Acesso em: 28/04/2017

- ROMERO, D.; VICENTE, A.; RAKOTOALY, R.H.; DUFOUR, S.E.; VEENING, J. W.; ARREBOLA, E.; CAZORLA, F. M.; KUIPERS, O. P.; PAQUOT, M.; PÉREZ-GARCÍA, A. **The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* towards *Podosphaera fusca***. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 2007. vol. 118, p.323–327.
- RUÍZ-GARCÍA, C.; BÉJAR, V.; MARTÍNEZ-CHECA, F.; LLAMAS, I.; QUESADA, E. ***Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, Southern Spain**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005. vol. 55, p.191-195.
- SAITOU, N & NEI, N. **The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. Molecular Biology Evolution, 1987. v.4, p. 406-425.
- SALMONI, P. S.; GERMANI, J. C.; VAN DER SAND, S. T. **Estudo de produção de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp. 1S**. Evidências, 2012. vol. 12, n. 2, p. 175-186.
- SANGER, F.; NICKELLEN, S.; COULSON, A.R. **DNA Sequencing with chain terminating inhibitors**. Proc. Natl.Acad.Sci.USA. 1977, vol.74, n.12, p.5463-5467.
- SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; da SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; dos SANTOS, L. C.; HIRUMALIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. **Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts**. Journal of Ethno-Pharmacology, 2005. vol. 97, p. 1-6.
- SCHALLMEY, M., SINGH, A., WARD, O.P. **Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production**. Canadian Journal Microbiology, 2004. vol. 50, p.11–17.
- SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BATISTA, C. R. V. **Obtenção de um extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* e sua atividade antimicrobiana e hemolítica**. Alimento e Nutrição Araraquara, 2005. vol.16, nº13, p.233-237.
- SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS. K.; LI, W.; LOPES, R.; MCWILLIAN, H.; REMMERT, M.; SODING, J.; HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D. **Fast, scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega**. Molecular Systems Biology, 2011. vol.7, n.1, p. 539-544.
- SILVA, A. B.; BRITO, J. M. **Controle Biológico de Insetos-Pragas e suas Perspectivas para o Futuro**. Revista Agropecuária Técnica, 2015. vol. 36, n.1, p. 248-258.
- SILVA, L. J. da. **Controle biológico de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de morango (*Fragaria x ananassa*) por linhagem *Streptomyces araujoniae* sp.** 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2013.
- SILVA, M. B. T.; COSTA, M.M.M., GALHARDO, M. C. G.; VALLE, A. C. F.; MAGALHÃES, M. de A. F. M.; SABROZA, P. C.; OLIVEIRA, R. M. de. **Esporotricose Urbana: Epidemia Negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil**. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2012. vol. 28, nº 10, p. 1867-1880.

SINCLAIR, J.B. 2003. **Control of seed-borne pathogens and diseases of soybean seeds and seedlings.** Pesticide Science, vol. 37, p. 15-19.

SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Defesa Vegetal. Disponível em: <http://sindiveg.org.br/balanco-2015-setor-de-agroquimicos-confirma-queda-de-vendas/>. Acesso em: 04/12/2017

SLEPECKY, R. A. & HEMPHILL, H. E. The genus *Bacillus*-nonmedical. In: A BOLWS, H. G.; TRUPER, M.; DWORKIN, W.; HARDER AND SCHLEIFER, K. H. Ed(s). **The Prokaryotes**. 1992, Springer-Verlag, New York. 2ª ed., p. 1687-1992.

SMITH, H.S. **On some phases of insect control by the biological method.** Journal Economic Entomology ,1909. vol.12 p.288–292.

SONG, B; RONG, Yan-Jun; ZHAO, MING-XIN; CHI, ZHEN-MING. **Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic.** Applied Microbiology Biotechnology, 2013. vol. 97, p.7141–7150.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. **Metabólitos secundários de Interesse farmacêuticos produzidos por fungos endofíticos.** UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde, 2014. v. 16, n. 4, p. 345-351.

STAMP, N. **Out of the quagmire of plant defense hypotheses.** The Quarterly Review of Biology, 2003. vol. 71, p. 23-55.

STEHR, F. W. Parasitoids and predators in the pest management. In: METCALF, R. L.; LUCKMANN, W. H. Ed(s). **Introduction to insect pest management.** New York: Wiley Interscience, 1975. p. 147-183.

SUPRAPTA, D. N. **Pontencial of microbial antagonists as biocontrol agents plant fungal pathogens.** Journal International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences, vol. 18, nº 2, p. 1-8, 2012.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M; HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia.** 3ª ed. Porto Alegre, Artmed Editora S.A., 2008. p. 197

TRABULSI, R.; ALTHERTUM, F. **MICROBIOLOGIA.** 4ª ed. São Paulo, Atheneu, 2005. p.718.

VALTER, j.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S. S.; **Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry of lipopeptide bio-surfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge.** Applied Environmental Microbiology, 2002. vol.68, p. 6210-6219.

VAN DEN BOSH, R; MESSENGER, P.S.; GUITERREZ, A.P. **An introduction to biological control,** New York, Plenum Press, 1982. p. 247.

VAN DRIESCHE, R.G.; BELLOWES, T.S. JR. **Biological control.** New York, Chapman and Hall, 1996. p.539.

VIGERS, A.J., ROBERTS, W.K. and SELITRENNIKOFF, C.P. **A new family of plant antifungal proteins.**

Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 1991. n. 4, p. 315–323.

VINING, L. C. Secondary Metabolism. In: REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 volumes**. Weinheim: VCH, 1986. vol. 4, p. 19-38.

WEI, Q.; LIAO, Y.; CHEN, Y.; WANG, S-H.; XU, Y.; TANG, L.; CHEN, F. **Isolation, characterization and antifungal activity of β -1,3-glucanase from seeds of *Jatropha curcas***. *South African Journal of Botany*, 2005. vol. 71, n.1, p. 95-99.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study**. *Journal of Bacteriology*, 1991. vol. 173, n. 2, p. 697-703.

WHITTAKER, R. H. **Communities and ecosystems**. Macmillan – New York. 2^a ed. 1975

WILLIAMS, D. W. & LEPLA, N. C. The future augmentation of beneficial arthropods. In: KAUFFMAN, W.C. & NECHOLS, J. R. (ED(s)). **Selection criteria and ecological consequences of importing natural enemies**. Lanham, M.d. Proc. Thomas Say Publications in Entomology – Entomological Society of America., 1992, p. 87-102.

WILLIAMS, D. H.; STONE, M. J.; HAUCK, P. R.; RAHMAN, S. K. **Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?** *Journal Natural Products*. 1989, vol 52, p. 1189-1208.

WILSON, F.; HUFFAKER, C. B. The physiology, scope and importance of biological control, p. 3-14. In: Huffaker, C. B.; Messenger, P. S. (eds.). **Theory and practice of biological control**. New York, *Academic Press*, 1976. p. 788.

WISOTZJSEY, J.D.; JUNIOR, P.J.; FOX, G.E.; DEINHARD. G.; PORALLA, K. **Comparative Sequence Analyses on the 16S rRNA(rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creative of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov.** *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1992, vol. 42, n°2, p. 263-269.

WOESE, C.R. & FOX, G.E. **Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977, vol. 74, n°11, p. 5088-5090.

WONG, J. H.; HAO, J.; CAO, Z.; QIAO, M.; XU, H.; BAI, Y.; NG, T. B. **An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens***. *Journal of Applied Microbiology*, 2008. vol. 105, p. 1888-1898.

WONG, J. H.; NG, T. B. **Studies on an Antifungal Protein and a Chromatographically and Structurally Related Protein Isolated from the Culture Broth of *Bacillus amyloliquefaciens***. *Protein & Peptide Letters*, 2009, vol.16, p.1399-1406.

YE, Yun-feng.; LI, Qi-qin; G., F.; YUAN, Gao-qing; MIAO, Jian-hua; W., L. **Identification of Antifungal Substance (Iturian A) Produced by *Bacillus subtilis* B47 and its Effect on Southern Corn Leaf Blight**. *Journal of Integrative Agriculture*, 2012. vol. 11, n° 1, p. 90-99.

YUAN, B., WONG, J. H.; Ng, T. B. **Studies on an Antifungal Protein and a Chromatographically and Structurally Related Protein Isolated from the Culture Broth of *Bacillus amyloliquefaciens***. Protein & Peptide Letters, 2009. vol.16, p.1399-1406.

YULIAR. **Influence of Palmitic Acid and Amino Acids Addition on Iturin A productivity by *Bacillus subtilis* RB14-CS**. Biodiversitas, 2005. Vol. 6, n°. 3, p. 171-174.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; CHAVES, G.M. **Controle químico de doenças de plantas**. Brasília: ABEAS, 1995, p. 307.

ZOUARI, I.; JLAIEL, L.; TOUNSI, S.; TRIGUI, M. **Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds**. Biologycal Control. 2016. vol.100, p.54-62.

APÊNDICE 1

Lista em ordem alfabética das espécies de *Bacillus* e números de acesso no GenBank das sequências usadas.

<i>B. altitudinis</i> . JQ320096	<i>B. licheniformis</i> . DQ228696	<i>B. pumilus</i> . EU287450
<i>B. altitudinis</i> . KT427442	<i>B. licheniformis</i> . EU162839	<i>B. pumilus</i> . EU596537
<i>B. amyloliquefaciens</i> . AF489591	<i>B. licheniformis</i> . EU660343	<i>B. pumilus</i> . EU660356
<i>B. amyloliquefaciens</i> . GQ280110	<i>B. licheniformis</i> . JN013199	<i>B. pumilus</i> . EU660362
<i>B. anthracis</i> . GQ280034	<i>B. megaterium</i> . AB334764	<i>B. pumilus</i> . EU660365
<i>B. anthracis</i> . GQ280088	<i>B. megaterium</i> . DQ789400	<i>B. safensis</i> . KF010796
<i>B. aryabhatai</i> . KF010788	<i>B. megaterium</i> . DQ973298	<i>B. siralis</i> . AF071856
<i>B. aryabhatai</i> . KX231810	<i>B. megaterium</i> . FJ544328	<i>B. subtilis</i> . AB016721
<i>B. aryabhatai</i> . MF537620	<i>B. megaterium</i> . FJ544337	<i>B. subtilis</i> . AB269766
<i>B. aryabhatai</i> . MF537622	<i>B. megaterium</i> . FJ544394	<i>B. subtilis</i> . AB305020
<i>B. aryabhatai</i> . MF537623	<i>B. megaterium</i> . FJ544404	<i>B. subtilis</i> . AB501343
<i>B. aryabhatai</i> . MF537625	<i>B. mojavensis</i> . AB021191	<i>B. subtilis</i> . AF198249
<i>B. atrophaeus</i> . AB021181	<i>B. mojavensis</i> . KR780382	<i>B. subtilis</i> . AF199464
<i>B. atrophaeus</i> . NR. 024689	<i>B. mojavensis</i> . NR. 024693	<i>B. subtilis</i> . JN013204
<i>B. boroniphilus</i> . EU660347	<i>B. mycoides</i> . AB021192	<i>B. tequilensis</i> . KX231808
<i>B. boroniphilus</i> . FJ544338	<i>B. mycoides</i> . FJ544336	<i>B. thuringiensis</i> . AF160221
<i>B. carboniphilus</i> . AB021182	<i>B. mycoides</i> . KF010791	<i>B. thuringiensis</i> . AM292029
<i>B. carboniphilus</i> . NR. 024690	<i>B. mycoides</i> . NR. 036880	<i>B. thuringiensis</i> . AM292033
<i>B. cereus</i> . AB334763	<i>B. nealsonii</i> . EU660368	<i>B. thuringiensis</i> . EF206345
<i>B. cereus</i> . EU660318	<i>B. nealsonii</i> . FJ544393	<i>B. thuringiensis</i> . JF912900
<i>B. cereus</i> . FJ527559	<i>B. nealsonii</i> . KF010795	<i>B. thuringiensis</i> . KF010790
<i>B. cereus</i> . FJ544331	<i>B. niabensis</i> . HM631829	<i>B. thuringiensis</i> . KF527200
<i>B. cereus</i> . FJ544349	<i>B. niabensis</i> . HM631849	<i>B. thuringiensis</i> . KT933210
<i>B. cereus</i> . FJ544356	<i>B. niacini</i> . AB021194	<i>B. thuringiensis</i> . MF139049
<i>B. cereus</i> . FJ883017	<i>B. niacini</i> . NR. 024695	<i>B. vallismortis</i> . AB021198
<i>B. circulans</i> . KF010794	<i>B. pseudocaliphilus</i> . NR. 026145	<i>B. vallismortis</i> . JF912890
<i>B. circulans</i> . KR780377	<i>B. pseudocaliphilus</i> . X76449	<i>B. vallismortis</i> . KM084861
<i>B. firmus</i> . DQ118015	<i>B. pseudofirmus</i> . KC581791	<i>B. vallismortis</i> . KM084863
<i>B. firmus</i> . EU660344	<i>B. pseudofirmus</i> . NR. 026139	<i>B. vallismortis</i> . NR. 024696
<i>B. firmus</i> . EU660357	<i>B. pseudofirmus</i> . X76439	<i>B. velezensis</i> . KT036395
<i>B. flexus</i> . AB021185	<i>B. pseudomycoides</i> . FJ544335	<i>B. velezensis</i> . KT427440
<i>B. flexus</i> . MF537618	<i>B. pumilus</i> . AB212862	<i>B. weihenstephanensis</i> . AB021199
<i>B. flexus</i> . NR. 024691	<i>B. pumilus</i> . DQ209209	<i>B. weihenstephanensis</i> . NR.
<i>B. licheniformis</i> . AY052767	<i>B. pumilus</i> . EU219735	24697
	<i>B. pumilus</i> . EU239356	