

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**ACTINOBACTÉRIAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE E PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO DE SOJA**

Fábulo Junior Nogueira Fernandes  
*Magister Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**FÁBULO JUNIOR NOGUEIRA FERNANDES**

**ACTINOBACTÉRIAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE E PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F363a  
2024  
Fernandes, Fábio Junior Nogueira, 1999-  
Actinobactérias como agentes de biocontrole e promoção de  
crescimento de soja / Fábio Junior Nogueira Fernandes. –  
Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (50 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Marisa Viera de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Microbiologia, 2024.

Referências bibliográficas: f. 41-44.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.780>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Fungos fitopatogênicos - Controle biológico. 2. Plantas -  
Microbiologia. 3. Actinobactéria. 4. Compostos bioativos.  
I. Queiroz, Marisa Viera de, 1964-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Mestrado em  
Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 632.96

**FÁBULO JUNIOR NOGUEIRA FERNANDES**

**ACTINOBACTÉRIAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE E PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de agosto de 2024.

Assentimento:

---

Fábulo Junior Nogueira Fernandes  
Autor

---

Marisa Vieira de Queiroz  
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 25/11/2024 às 11:02:00 e pela orientadora em 25/11/2024 às 11:12:54. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **313V.95SC.AW2P** e clique no botão 'Validar documento'.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a Deus, por nunca me desamparar e por todos os momentos em que me sentia sozinho, sua presença me acalmava.

À minha família, que sempre foi o meu grande motivo de querer vencer na vida e dar mais confortos a eles. Minha mãe Michelle, que é minha melhor amiga e com quem eu compartilho todas as dores e conquistas.

Meu pai Fábulo, pelo suporte em todos os momentos que precisei.

Aos meus avós maternos Rubens e Maria da Penha, por serem como pais para mim e apoiarem todas as minhas decisões.

Minha irmã Helena, por ser minha irmã mais nova e quem me incentiva a transformar o mundo em um lugar melhor para a geração dela.

Agradeço ao Thiago por todo o companheirismo, cuidado e paciência. Sem ele, essa etapa em Viçosa teria sido uma jornada muito mais árdua e solitária. Sua presença tornou cada desafio mais leve e cada conquista mais significativa.

Aos meus amigos que fiz em Viçosa, em especial o Luiz Eliel, que chegou em minha vida para somar e compartilhar momentos felizes vividos, por todas as vezes que prontamente me ajudou.

Aos amigos Rafael Freitas e Ramon Ramos, meus velhos amigos, que sempre me incentivaram e contribuem muito para o meu crescimento profissional.

À Cleonice Salgado que, além de melhor pós-doc que alguém poderia ter, virou uma amiga que me ensinou a ser um profissional melhor e, acima de tudo, uma pessoa melhor.

Aos melhores estagiários Yara, Jamile e Felipe, por toda ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos por todo o acolhimento, momentos de descontração e momentos de contribuição para o meu crescimento profissional que todos tiveram. Em especial ao Rafael Rosa que se tornou um amigo que levarei para a vida, muito obrigado por todo incentivo e todo o conhecimento compartilhado.

À minha orientadora Marisa Vieira de Queiroz, pela oportunidade de trabalhar com você, por todas as conversas, incentivos e orientação para a construção desse trabalho. Além de sempre garantir momentos de confraternização e descontração que ficam marcados na memória. Além

disso, a professora Marisa, é exemplo de seriedade e responsabilidade com a pesquisa. Muito obrigado por essas oportunidades.

À banca examinadora, Dr. Gilvan Ferreira da Silva e Dra. Thalita Suelen Avelar Monteiro pelas valiosas contribuições que enriquecem esse trabalho e pela disponibilidade.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas, no estágio-ensino e suporte técnico para o desenvolvimento da pesquisa de mestrado. Especialmente, Patrícia, Letícia e Sr. Paulo.

Um agradecimento especial à Universidade Federal de Viçosa (UFV), uma instituição renomada a qual tenho imenso orgulho de fazer parte da sua história. Às agências de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FAPEMIG por todo o suporte financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

FERNANDES, Fábulo Junior Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **ACTINOBACTÉRIAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE SOJA**. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz.

As actinobactérias são notáveis entre as bactérias pela capacidade de produzir uma ampla gama de compostos bioativos, muitos dos quais exibem propriedades antimicrobianas ou conferem algum benefício às plantas. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a capacidade de controlar os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, além da capacidade de promover o crescimento da soja de quatro cepas de actinobactérias (*Streptomyces* sp. 3F, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 6O e *Lentzea* sp. 7P). Foi avaliado *in vitro* a capacidade dos isolados de inibir o crescimento dos patógenos e os parâmetros relacionados à promoção de crescimento vegetal, como a produção de amônia, síntese de ácido indol acético (AIA), produção de sideróforos, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio. Experimentos em casa de vegetação foram conduzidos para validar o potencial de inibição dos patógenos e a promoção do crescimento da soja. Para o controle biológico foi avaliada a aplicação dos esporos das actinobactérias de maneira localizada na planta, onde o sintoma da doença aparece, ou nas sementes. Os resultados mostraram que o isolado *Streptomyces* sp. 4L foi o mais eficaz na supressão de *S. sclerotiorum* (percentual de controle de 71,67%) quando aplicado nas folhas. Todos os isolados demonstraram diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) do controle positivo quando as sementes de soja foram tratadas com as bactérias. Para a supressão de *R. solani*, a aplicação dos esporos no solo foi mais eficiente, com maiores percentuais de controle para *Streptomyces* sp. 3F (60,2%), seguido de *Streptomyces* sp. 6O (61,4%). A supressão de *R. solani* por meio do tratamento de sementes não demonstrou diferença estatística em relação ao tratamento das folhas. Todos os isolados foram capazes de produzir amônia, fixar nitrogênio e produzir AIA *in vitro*. *In vivo*, os destaques foram para *Streptomyces* sp. 4L e 6O na promoção do crescimento da soja. Os experimentos *in vivo* corroboraram os resultados *in vitro* e confirmaram que esses isolados bacterianos precisam ser explorados em pesquisas futuras, dado ao potencial de contribuição para uma agricultura mais sustentável e na aplicação de tecnologias de bioinsumos.

Palavras-chave: controle biológico; fitopatógenos; actinomycetota; sustentabilidade agrícola

## ABSTRACT

FERNANDES, Fábulo Junior Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2024. **Actinobacteria as Biocontrol Agents and Growth Promoters in Soybeans**. Adviser: Marisa Vieira de Queiroz.

Actinobacteria are notable among bacteria for their ability to produce a wide range of bioactive compounds, many of which exhibit antimicrobial properties or provide some benefit to plants. In this study, the objective was to evaluate the ability to control the phytopathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*, as well as to promote soybean growth, using four strains of actinobacteria (*Streptomyces* sp. 3F, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 60, and *Lentzea* sp. 7P). The capacity of the isolates to inhibit pathogen growth was assessed *in vitro*, along with parameters related to plant growth promotion, such as ammonia production, indole-3-acetic acid (IAA) synthesis, siderophore production, phosphate solubilization, and nitrogen fixation. Greenhouse experiments were conducted to validate the potential for pathogen inhibition and soybean growth promotion. For biological control, the application of actinobacteria spores was evaluated either directly on the plant, where disease symptoms appear, or on the seeds. The results showed that the isolate *Streptomyces* sp. 4L was the most effective in suppressing *S. sclerotiorum* (71.67% control) when applied to the leaves. All isolates demonstrated statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) from the positive control when soybean seeds were treated with the bacteria. For the suppression of *R. solani*, spore application to the soil was more efficient, with the highest control percentages observed for *Streptomyces* sp. 3F (60.2%) and *Streptomyces* sp. 60 (61.4%). The suppression of *R. solani* through seed treatment showed no statistical difference compared to foliar treatment. All isolates were capable of producing ammonia, fixing nitrogen, and producing IAA *in vitro*. *In vivo*, *Streptomyces* sp. 4L and 60 stood out in promoting soybean growth. The *in vivo* experiments corroborated the *in vitro* results and confirmed that these bacterial isolates need to be explored in future research, given their potential to contribute to more sustainable agriculture and the application of bio-input technologies.

Keywords: biological control; phytopathogens; actinomycetota; agricultural sustainability

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Micrografias do isolado <i>Streptomyces</i> sp. 3F.....   | 24 |
| <b>Figura 2</b> - Micrografias do isolado <i>Lentzea</i> sp. 7P.....  | 24 |
| <b>Figura 3</b> - Fotografias do teste semi-quantitativo da produção de quitinase por actinobactérias.....  | 28 |
| <b>Figura 4</b> - Fotografias da avaliação da atividade antagônica por meio da cultura dupla entre <i>Streptomyces</i> sp. 3F, 4L, 6O e <i>Lentzea</i> sp. 7P e os fitopatógenos.....   | 29 |
| <b>Figura 5</b> - Avaliação da atividade antagônica por meio da produção de compostos voláteis entre actinobactérias ( <i>Streptomyces</i> sp. 3F, 4L, 6O e <i>Lentzea</i> sp. 7P) e os fitopatógenos <i>S. sclerotiorum</i> e <i>R. solani</i> ..... | 30 |
| <b>Figura 6</b> - Avaliação do efeito de actinobactérias ( <i>Streptomyces</i> sp. 3F, 4L e 6O e <i>Lentzea</i> sp. 7P) na supressão do crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> (S.s.) <i>in vivo</i> .....   | 31 |
| <b>Figura 7</b> - Avaliação do antagonismo <i>in vivo</i> das actinobactérias ( <i>Streptomyces</i> sp. 3F, <i>Streptomyces</i> sp. 4L, <i>Streptomyces</i> sp. 6O e <i>Lentzea</i> sp. 7P) a <i>S. sclerotiorum</i> .....                            | 32 |
| <b>Figura 8</b> - Avaliação do efeito de actinobactérias ( <i>Streptomyces</i> sp. 3F, 4L e 6O e <i>Lentzea</i> sp. 7P) na supressão do crescimento de <i>R. solani</i> (R.s.) <i>in vivo</i> .....   | 33 |
| <b>Figura 9</b> - Avaliação do antagonismo <i>in vivo</i> das actinobactérias ( <i>Streptomyces</i> sp. 3F, <i>Streptomyces</i> sp. 4L, <i>Streptomyces</i> sp. 6O e <i>Lentzea</i> sp. 7P) a <i>R. solani</i> .....                                  | 34 |
| <b>Figura 10</b> - Avaliação do efeito de actinobactérias ( <i>Streptomyces</i> sp. 3F, 4L e 6O e <i>Lentzea</i> sp. 7P) no crescimento da soja no cultivo <i>in vivo</i> .....   | 37 |
| <b>APÊNDICE A</b>   |    |
| <b>Figura 1</b> - Capacidade de metabolização de diferentes fontes de carbono.....  | 45 |
| <b>Figura 2</b> - Tolerância ao NaCl.....   | 46 |
| <b>Figura 3</b> - Crescimento em diferentes faixas de pH.....   | 47 |
| <b>Figura 4</b> - Avaliação semiquantitativa da produção de diferentes enzimas de interesse biotecnológico.....   | 48 |
| <b>Figura 5</b> - Avaliação da atividade antagônica Cultura Dupla.....  | 48 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 6</b> - Avaliação da atividade antagônica dos compostos voláteis.....  | 49 |
| <b>Figura 7</b> - Ensaio de promoção de crescimento <i>in vitro</i> de <i>Streptomyces</i> sp. 3F, 4L, 6O e <i>Lentzea</i> sp. 7P..... | 50 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Assimilação de fontes de carbono pelas actinobactérias.....   | 25 |
| <b>Tabela 2</b> - Tolerância das actinobactérias a diferentes concentrações de NaCl e a diferentes valores de pH..... | 26 |
| <b>Tabela 3</b> - Índice de atividade enzimática (IE) de diferentes enzimas produzidas pelas actinobactérias.....     | 26 |
| <b>Tabela 4</b> - Avaliação do potencial de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> de actinobactérias.....   | 35 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Quadro 1</b> - Identificação e origem do isolamento das Actinobactérias utilizadas..... | 16 |
|--|----|

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 14 |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 15 |
| 2.1. Microrganismos e condições de cultivo .....                                     | 15 |
| 2.2. Caracterização das actinobactérias .....  | 16 |
| 2.2.1. Caracterização dos esporos.....   | 16 |
| 2.2.2. Crescimento em diferentes valores de pH e salinidade .....                    | 16 |
| 2.2.3. Crescimento em diferentes fontes de carbono .....                             | 17 |
| 2.2.4. Produção de enzimas .....   | 17 |
| 2.3. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial antagônico das actinobactérias.....      | 18 |
| 2.3.1. Produção de quitinases .....  | 18 |
| 2.3.2. Cultura dupla .....   | 18 |
| 2.3.3. Compostos orgânicos voláteis .....  | 18 |
| 2.4. Avaliação do potencial antagônico <i>in vivo</i> .....                          | 19 |
| 2.4.1. Microbiolização das sementes com actinobactérias .....                        | 19 |
| 2.4.2. Tratamento localizado nas plantas com actinobactérias.....                    | 19 |
| 2.4.3. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....   | 20 |
| 2.4.4. <i>Rhizoctonia solani</i> .....   | 20 |
| 2.5. Avaliação do potencial em promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> ..... | 21 |
| 2.5.1. Produção de amônia.....   | 21 |
| 2.5.2. Fixação biológica de nitrogênio .....   | 21 |
| 2.5.3. Solubilização de fosfato inorgânico .....                                     | 21 |
| 2.5.4. Produção de ácido indolacético (AIA) .....                                    | 22 |
| 2.5.5. Produção de sideróforos .....   | 22 |
| 2.6. Avaliação da promoção de crescimento da soja.....                               | 22 |
| 2.7. Análise estatística .....   | 23 |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 23 |
| 3.1. Caracterização das actinobactérias .....  | 23 |
| 3.2. Assimilação de diferentes de fontes de carbono.....                             | 25 |
| 3.3. Tolerância a cloreto de sódio e diferentes valores de pH.....                   | 25 |
| 3.4. Síntese de enzimas de interesse agrônômico e biotecnológico .....               | 26 |
| 3.5. Inibição de fitopatógenos.....  | 27 |
| 3.5.1. Produção de quitinase.....  | 27 |
| 3.5.2. Produção de compostos antimicrobianos .....                                   | 28 |
| 3.5.3. Produção de compostos orgânicos voláteis (COVs).....                          | 29 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.6. Potencial antagônico <i>in vivo</i> contra patógenos da soja.....        | 30        |
| 3.7. Potencial para promover o crescimento vegetal <i>in vitro</i> .....      | 35        |
| 3.8. Actinobactérias promovem o crescimento da soja em casa de vegetação..... | 35        |
| <b>4. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                       | <b>41</b> |
| <b>APÊNDICE A .....</b>   | <b>45</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* L.) é uma das culturas mais importantes do mundo. As sementes de soja são importantes tanto para a farinha rica em proteínas quanto para o óleo vegetal (Hartman *et al.*, 2011). Em 2020, a produção mundial de soja atingiu 353 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2020), com o Brasil ocupando a primeira posição entre os produtores, alcançando 126 milhões de toneladas na safra 2020/21 (CONAB, 2022). Na safra de 2023/24, o país produziu 147 milhões de toneladas de soja, consolidando sua posição de maior produtor global (CONAB, 2024). No entanto, a produção de soja enfrenta desafios significativos devido a fatores abióticos, como variações climáticas, disponibilidade de nutrientes no solo, salinidade e resposta ao fotoperíodo. Além disso, fatores bióticos, como a incidência de doenças causadas por patógenos, também impactam negativamente o cultivo (Hartman *et al.*, 2011). Entre as doenças fúngicas de maior impacto epidemiológico estão a ferrugem asiática, o mofo branco, a podridão radicular e a antracnose, que são tradicionalmente controladas por meio de produtos químicos, os quais, apesar de aumentarem a produtividade, podem causar danos à saúde humana e ao equilíbrio dos agroecossistemas (Hartman *et al.*, 2011; Bandara *et al.*, 2020).

Dentre as doenças que acometem a soja, a ferrugem asiática, provocada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, é uma das principais preocupações para os produtores, afetando todas as partes da planta em diferentes estágios de desenvolvimento (Hossain *et al.*, 2024). O mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, afeta mais de 600 espécies de plantas e é uma doença significativa da soja em muitas partes do mundo (Tu, 1989; Boland; Hall, 1994; Willbur *et al.* 2019). Já a podridão radicular, causada por *Rhizoctonia solani* Kühn, impacta o crescimento das plantas ao causar lesões necróticas nas raízes e caules, podridão do hipocótilo com lesão marrom-avermelhada, causando perdas significativas na produção (Singh; Schwartz, 2010). Outra doença importante para a cultura da soja é a antracnose, causada por *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & WD Moore] que é disperso principalmente por sementes de soja infectadas. A doença afeta diversas partes da planta, incluindo caules, pecíolos, folhas e vagens e resulta em lesões escuras e necróticas nas folhas e em outras partes da planta, podendo provocar murchamento e queda prematura das folhas (Sharma *et al.*, 2011; Kumar, 2016).

As actinobactérias são bactérias filamentosas Gram-positivas pertencentes ao filo *Actinomycetota* e à ordem *Actinomycetales*. Essas bactérias são encontradas principalmente em ambientes terrestres e aquáticos, com uma presença significativa no solo. Elas atuam na

transformação de componentes do solo em matéria orgânica por meio da decomposição de matéria vegetal, animal e fúngica. Valorizadas por sua capacidade de produzir metabólitos secundários, as actinobactérias são exploradas para a produção de antibióticos e controle de doenças (Hazarika; Thakur, 2020). Técnicas modernas de sequenciamento e mineração de genomas têm revelado o vasto potencial das actinobactérias para a produção de novos metabólitos secundários, expandindo suas aplicações biotecnológicas (Novakova *et al.*, 2013; Cimermancic *et al.*, 2014). Além disso, as actinobactérias desempenham um papel fundamental na agricultura sustentável, contribuindo para a solubilização de fósforo, fixação de nitrogênio e indução da resistência sistêmica em plantas (Sathya *et al.*, 2017).

Diante desse cenário, é essencial buscar alternativas sustentáveis, como o uso de microrganismos, especialmente actinobactérias, para o controle biológico de fungos fitopatogênicos e ainda que, como dupla funcionalidade, promovam o crescimento vegetal. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de quatro isolados de Actinomycetota em suprimir *S. sclerotiorum* e *R. solani* e promover o crescimento da soja.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismos e condições de cultivo

As actinobactérias utilizadas neste estudo foram isoladas do solo por Mogollón-Ortiz e colaboradores (2024) em diferentes lugares do Brasil, conforme o Quadro 1. Os isolados fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, alocado no instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para os testes *in vitro* e *in vivo*, os isolados foram cultivados em ágar ISP2 (4 g/L de extrato de levedura, 4 g/L de extrato de malte, 4 g/L de glicose, 12 g/L de ágar) pH 7,2, durante sete dias a 28 °C e, quando necessário, discos das colônias foram transferidos para frascos de 250 mL contendo 100 g de arroz pré-cozido, cultivados por cerca de três a cinco dias a 28 °C para se obter uma maior esporulação bacteriana.

**Quadro 1.** Identificação e origem do isolamento das Actinobactérias utilizadas.

| Identificação              | Origem                             |
|----------------------------|------------------------------------|
| <i>Streptomyces</i> sp. 3F | Universidade Federal de Viçosa, MG |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4L | Universidade Federal de Viçosa, MG |
| <i>Streptomyces</i> sp. 6O | São Gabriel do Oeste, MS           |
| <i>Lentzea</i> sp. 7P      | São Gabriel do Oeste, MS           |

Os fungos fitopatogênicos utilizados foram *S. sclerotiorum* 15B da coleção do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos (UFV) e *R. solani* 2829, isolado do viveiro, da coleção do Laboratório de Patologia Florestal (UFV). O cultivo de *S. sclerotiorum* e *R. solani* foi realizado em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (KASVI, Brasil), durante cinco dias a 25 °C.

## 2.2. Caracterização das actinobactérias

### 2.2.1. Caracterização dos esporos

Para caracterizar os esporos das actinobactérias, lamínulas foram posicionadas em um ângulo de cerca de 45° em ágar ISP2. As actinobactérias foram inoculadas ao redor dessas lamínulas e incubadas durante sete dias a 28 °C para crescerem sobre a parte da lamínula mais próxima ao meio de cultura. Após esse período, as actinobactérias foram observadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL, Japão; JSM-6010LA) no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura - DPF. As lamínulas passaram por um processo de fixação química utilizando formaldeído 2% e glutaraldeído 2% a 4 °C por 14 horas. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas com tampão fosfato e desidratadas em etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) nas concentrações 30, 50, 70, 80 e 90%, sendo submetidas a três etapas de dez minutos em cada concentração. Uma desidratação final foi feita em álcool absoluto por 30 minutos. Após o processo de desidratação, as lamínulas foram levadas para o secador ponto crítico (Ponto crítico CPD – 030 Balzers), colocadas em *stubs* e metalizadas (Metalizador Sputter Coater Quorum Q150RS).

### 2.2.2. Crescimento em diferentes valores de pH e salinidade

Foi avaliado o crescimento das actinobactérias em diferentes valores de pH e salinidade em ágar ISP2. As concentrações de NaCl testadas foram: 1% (equivalente a 0,17 M), 2% (0,34

M), 4% (0,68 M), 8% (1,34 M), 10% (1,71 M) e 12% (2,22 M). Os valores de pH testados foram: 4, 6, 7, 8, 10 e 12.

### 2.2.3. Crescimento em diferentes fontes de carbono

A capacidade de metabolizar fontes únicas de carbono (glicose, galactose, manitol, celulose, amido, xilose, sacarose, inositol e arabinose) na concentração final de 1% (p/v), foi avaliada em um meio mínimo basal composto por:  $K_2HPO_4$  1,5 (g/L);  $MgSO_4$  0,5 (g/L);  $CaCl_2$  0,1 (g/L);  $(NH_4)_2SO_4$  5 (g/L);  $KNO_3$  0,5 (g/L). Esse meio foi enriquecido com 2 mL de uma solução traço de sais constituída de  $H_3BO_3$  0,05 (g/L);  $CuSO_4$  0,004 (g/L);  $FeCl_3$  0,02 (g/L); KI 0,01 (g/L);  $MnSO_4$  0,04 (g/L);  $ZnSO_4$  0,04 (g/L). Também foi adicionado ao mesmo meio 0,1 mL de uma solução de vitaminas: biotina 0,2 mg; pantotenato de cálcio 10 mg; ácido p-aminobenzoico 10 mg; cloridrato de tiamina 20 mg, 100 mL de  $H_2O$ . O meio basal contendo glicose foi usado como controle positivo e o meio basal sem fonte de carbono foi usado como controle negativo.

### 2.2.4. Produção de enzimas

Os isolados foram avaliados quanto a produção de celulase, pectinase e xilanase. Para produção de celulase, foi utilizado o meio CMC ágar, em que foi usada uma concentração de CMC de 0,2% ( $NaNO_3$  2 g/L,  $K_2HPO_4$  1 g/L,  $MgSO_4$  0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, carboximetilcelulose (CMC) sal sódico 2 g/L, peptona 0,2 g/L, ágar 17 g/L) (Kasana *et al.*, 2008). Para a xilanase foi utilizado o meio ágar xilano, que foi enriquecido com ágar nutriente e xilana 0,2% (ágar nutriente 28 g/L, xilana 2 g/L) (Priya *et al.*, 2012). Para a avaliação da produção de pectinase foi utilizado o Meio Mínimo Pectina, contendo pectina cítrica em sua composição (pectina 10 g/L, extrato de levedura 1 g/L, ágar 15 g/L). Para o ensaio de produção de amilase foi utilizado o meio ágar nutriente suplementado com 0,5% de amido solúvel. Assim, 5  $\mu$ L de uma suspensão de  $10^7$  esporos/mL dos isolados foram inoculados no centro das placas. Em seguida, as culturas foram incubadas por sete dias a 28 °C. Após o período de incubação, o meio de cultura foi coberto com a solução iodeto de potássio-iodo (0,3%  $I_2$  e 0,6% KI). As colônias que formaram um halo ao seu redor, foram consideradas positivas para produção das enzimas citadas acima.

Para o ensaio de produção de protease, foi utilizado o meio contendo leite em pó desnatado (10 g/L) e ágar (15 g/L). Uma suspensão de  $10^7$  esporos/mL foi inoculada no centro de cada placa, e posteriormente as culturas foram incubadas por sete dias a 28 °C. Após o

período de incubação, as colônias que formaram um halo ao seu redor foram consideradas positivas para produção de protease.

O índice de atividade enzimática (IE) foi calculado para as todas as enzimas testadas pela razão entre o diâmetro do halo formado e o diâmetro da colônia (Hankin; Anagnostakis, 1975).

### 2.3. Avaliação *in vitro* do potencial antagonico das actinobactérias

#### 2.3.1. Produção de quitinases

Para o ensaio de produção de quitinases foi utilizado o meio com quitina coloidal (quitina coloidal 15 g/L, extrato de levedura 0,5 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,3 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,36 g/L, ágar 15 g/L). Foram inoculados 5  $\mu\text{L}$  de uma suspensão contendo  $10^7$  esporos/ml no centro de cada placa e em seguida, as culturas foram incubadas por sete dias a 28 °C. Após o período de incubação, o meio de cultura foi coberto com a solução iodeto de potássio-iodo (0,3%  $\text{I}_2$  e 0,6% KI). As colônias que formaram um halo ao seu redor foram consideradas positivas para produção de quitinases. O índice de atividade enzimática (IE) foi calculado como descrito no item 2.2.4.

#### 2.3.2. Cultura dupla

A avaliação do potencial antagonico foi realizada pelo método de cultura dupla, adaptado de Dennis e Webster (1971). Inicialmente, 20  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de esporos dos isolados de actinobactérias foram inoculados ( $10^7$  esporos/ mL) em um lado da placa de Petri contendo meio BDA, em que foi feita uma estria a 1,5 cm da borda da placa. Após 24 horas, no lado oposto, foi inoculado um disco de micélio (5mm) dos fungos fitopatogênicos. Como controle foi avaliado o crescimento dos fungos fitopatogênicos, sem a inoculação prévia da actinobactéria. As culturas foram incubadas a 25 °C. O ensaio foi realizado com os fitopatógenos *S. sclerotiorum* e *R. solani*, com três repetições biológicas. A porcentagem de inibição do crescimento fúngico (IC) foi calculado pela seguinte fórmula:  $(\text{IC}) = \frac{C-T}{C} * 100$ , onde C é o diâmetro da colônia do fungo no controle (sem inoculação prévia da bactéria) e T é o diâmetro do crescimento micelial do tratamento (inoculação prévia da bactéria).

#### 2.3.3. Compostos orgânicos voláteis

A avaliação foi realizada pelo método da placa selada de Fernando e colaboradores (2005). Em uma placa de Petri, os isolados de actinobactérias foram inoculados (100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de  $10^7$  esporos/ mL) em meio ISP2, e em outra placa de Petri foi inoculado um disco

de micélio (5 mm) dos fungos fitopatogênicos em meio BDA. A placa contendo o patógeno foi invertida sobre a placa onde foi inoculada a bactéria e posteriormente essas placas foram seladas com Parafilm. As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias. Como controle foi realizado o mesmo procedimento, sem a inoculação da bactéria. O experimento foi conduzido em triplicata, e o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento fúngico foi realizado como descrito no item 2.3.2.

## 2.4. Avaliação do potencial antagônico *in vivo*

### 2.4.1. Microbiolização das sementes com actinobactérias

Sementes de soja (Brasmax – Tanque 73i75) foram desinfestadas com cloro gasoso formado pela reação entre 100 mL de hipoclorito de sódio e 3 mL de ácido clorídrico (Wojtowicz, 2000) durante quatro horas em uma cabine de exaustão e mantidas *overnight* em suspensão de esporos na concentração de  $10^7$  esporos/mL dos isolados de actinobactérias. Para o controle negativo, as sementes foram mantidas apenas em água destilada estéril. Sementes microbiolizadas foram transferidas para tubetes de 180 cm<sup>3</sup> contendo substrato MecPlant. Na semeadura, foram colocadas duas sementes por vaso, e posteriormente foi realizado um desbaste, de forma que ficasse apenas uma planta por vaso. Para os controles, foram utilizadas sementes tratadas com água destilada estéril, e o patógeno foi inoculado no estágio vegetativo V1. Quatro tratamentos foram realizados, com 10 plantas para cada tratamento: 1. Controle negativo (sementes tratadas com água destilada); 2. Controle positivo (plantas tratadas somente com o patógeno); 3. Plantas tratadas apenas com o isolado de actinobactéria (sementes microbiolizadas com actinobactérias); 4. Plantas tratadas com o isolado de actinobactéria e o fitopatógeno (sementes microbiolizadas com actinobactérias).

### 2.4.2. Tratamento localizado nas plantas com actinobactérias

Para a aplicação localizada, uma suspensão de esporos das actinobactérias ( $10^7$  esporos/mL) foi aspergida nas plantas de soja no estágio vegetativo V1 conforme o local de aplicação de cada patógeno na planta. Após 24 horas de aplicação dos esporos das actinobactérias foi feita a aplicação dos fitopatógenos. Quatro tratamentos foram realizados, com 10 plantas para cada tratamento: 1. Controle negativo (plantas aspergidas com água destilada); 2. Controle positivo (plantas tratadas somente com o patógeno); 3. Plantas tratadas apenas com o isolado de actinobactéria; 4. Plantas tratadas com o isolado de actinobactéria e o fitopatógeno.

#### 2.4.3. *Sclerotinia sclerotiorum*

Para a inoculação, um disco de micélio de *S. sclerotiorum* foi colocado sobre cada folha unifoliada, e as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro com programação de irrigação a cada hora para manter a umidade. Após 7 dias, as plantas foram avaliadas utilizando a escala de notas descrita por Tolêdo-Souza e Costa (2003), que se baseia na intensidade e comprimento da lesão, em que: 1 = nenhum sintoma visível; 2 = lesão circular começando a se desenvolver; 3 = lesão até 1,0 cm de comprimento; 4 = lesões entre 1,0 e 1,5 cm; 5 = lesões maiores que 1,5 cm; 6 = lesões no pedúnculo e presença de micélio e murcha em uma das folhas; 7 = lesões no pedúnculo e presença de micélio e murcha em ambas as folhas; 8 = sintomas de murcha geral; 9 = planta morta. Com os dados da severidade foi calculado o índice de doença (ID) e o ensaio foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições experimentais.

#### 2.4.4. *Rhizoctonia solani*

Para *R. solani*, as plantas dos grupos foram inoculadas com um disco de 5 mm do micélio do fungo na base do caule. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 24 horas em câmara de crescimento na ausência de luz (escuro) e após esse período foram distribuídas em bancadas da casa de vegetação. A avaliação do tombamento foi feita após 10-15 dias da inoculação do fitopatógeno, por meio do registro dos valores escala de notas que se baseia, principalmente, na intensidade e comprimento da lesão, em que: 0 = plantas sadias ; 1 = intensidade leve, apenas uma aplicação no hipocótilo, coloração marrom-avermelhada, alongada (menor ou igual a 0,5 cm); 2 = intensidade moderada, lesões alongadas medindo entre 0,5 e 2 cm, isoladas ou coalescidas, coloração marrom-avermelhada presente no hipocótilo e/ou no sistema radicular; 3 = intensidade severa, lesão alongada e extensa (maior que 2 cm), deprimida e com constrição, coloração marrom-avermelhada, abrangendo o hipocótilo e o sistema radicular. Com os dados da severidade foi calculado o índice de doença (ID) e o ensaio foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições experimentais.

## 2.5. Avaliação do potencial em promoção de crescimento vegetal *in vitro*

### 2.5.1. Produção de amônia

Um volume de 200  $\mu\text{L}$  de uma suspensão contendo  $10^7$  esporos/mL foi transferido para 25 mL de uma solução aquosa de peptona a 1%. A cultura resultante foi então submetida a um período de incubação de sete dias a uma temperatura constante de 28 °C e 120 rpm. Após o período de incubação, a cultura foi centrifugada a 1000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi misturado com o reagente de Nessler em uma proporção de 1:1. O reagente de Nessler serve para detectar a presença de nitrogênio amoniacal. Um resultado positivo foi evidenciado pela formação de um precipitado característico de cor amarela acastanhada, indicando a produção de amônia (Cappuccino; Sherman, 2014).

### 2.5.2. Fixação biológica de nitrogênio

Foi empregado o meio NFb, composto por ácido málico na concentração de 5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 0,5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 0,2 g/L, NaCl a 0,1 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 0,02 g/L, Fe (III) EDTA a 1,64% (equivalente a 4 mL/L), ágar a 1,8 g/L, juntamente com a adição de 2 mL/L de uma solução de micronutrientes composta por  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 0,4 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 0,12 g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  a 1,4 g/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 1,0 g/L e  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a 1,5 g/L. O pH do meio foi ajustado para 6,8. Após a medição do pH, foram incorporados 2 mL/L de solução de azul de bromotimol 0,5% em KOH 0,2 M. Após a esterilização por autoclave, foi adicionado 1 mL.L<sup>-1</sup> de uma solução vitamínica, esterilizada por filtração composta de Biotina a 0,1 g/L e Piridoxol – HCL a 0,2 g/L. Posteriormente, 10 mL do meio foi dispensado em tubos de ensaio (Döbereiner et al., 1995). As actinobactérias foram introduzidas no meio com uma agulha de inoculação e incubadas a 28 °C. Um resultado positivo foi indicado pelo crescimento do microrganismo e pela mudança de pH do meio, que alterou a cor verde para azul.

### 2.5.3. Solubilização de fosfato inorgânico

Foi empregado o meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium) composto por glicose a 10 g/L,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  a 5 g/L,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 0,25 g/L, KCl a 0,2 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 0,1 g/L e ágar a 18 g/L. Os isolados de actinobactérias foram inoculados no centro das placas de cultivo e posteriormente submetidos a um período de incubação de 7 dias, mantendo a temperatura de 28°C (Nautiyal, 1999). Um resultado positivo,

indicativo de solubilização de fosfato, foi marcado pela manifestação de um halo claro distinto ao redor da colônia.

#### 2.5.4. Produção de ácido indolacético (AIA)

Uma suspensão de esporos foi inoculada em 10 mL de TSB (Tryptic Soy Broth) (peptona caseína 10 g/L, peptona 5 g/L, NaCl 5 g/L, fosfato de potássio dibásico 2,5 g/L, glucose 2,5 g/L) suplementado com triptofano 5 mM. A cultura foi incubada por sete dias a 28 °C, seguida de centrifugação por cinco minutos a 1000 rpm e o sobrenadante foi misturado ao reagente Salkowski na proporção 1:1. Após 30 minutos de reação a 26 °C no escuro, o resultado positivo para produção de AIA foi indicado pela presença de coloração rosa (Bano e Musarrat, 2003).

#### 2.5.5. Produção de sideróforos

Foi utilizada a metodologia de Schwyn e Neilands (1987), com adaptações, utilizando o meio CAS (Chromeazurol Agar Assay) para avaliar a produção de sideróforos. Foram inoculados 5 µL de uma suspensão de  $10^7$  esporos/ mL no centro das placas de Petri contendo ágar nutriente (KASVI, Brasil). Posteriormente, as culturas foram incubadas a 28 °C por quatro a cinco dias. Após o período de incubação, foram adicionados 10 mL de meio CAS/PIPES: CAS (6 mg de CAS dissolvidos em 5 mL de água destilada e 1 mL de solução de Ferro III composta por 1 mM FeCl<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O em 10 mM HCl, complementado com 7,3 mg de HDTMA-Brometo de hexadeciltrimetilamônio previamente dissolvido em 4 mL de água destilada) com meio PIPES (meio PIPES a 30,24 g/L e ágar a 9,0 g/L;). Após a esterilização, foram misturados 10 mL de meio CAS e 90 mL de meio PIPES. As placas foram incubadas novamente por 24 h. A presença de halos laranja circundando as colônias bacterianas indicou a produção de sideróforos.

#### 2.6. Avaliação da promoção de crescimento da soja

Sementes de soja (Brasmax – Tanque 73i75) foram desinfestadas e microbiolizadas de acordo com o item 2.6.1. Para o controle negativo, as sementes foram mantidas apenas em água destilada estéril. Sementes microbiolizadas foram transferidas para vasos contendo substrato MecPlant. Na semeadura foram colocadas duas sementes por vaso de 2 L e posteriormente foi realizado um desbaste. Os tratamentos foram sementes tratadas com água destilada estéril e sementes tratadas com as actinobactérias, com 10 plantas para cada tratamento. Após um período de cultivo de 3 semanas, estágio vegetativo V2, parâmetros de crescimento como

tamanho da parte aérea, tamanho da raiz, peso seco da parte aérea e peso seco da raiz foram submetidos à avaliação. As dimensões da parte aérea e do sistema radicular foram medidas com uma régua. Posteriormente, esses segmentos foram fracionados em porções menores, secados em sacos de papel em estufa a 60 °C e pesadas individualmente em balança de precisão. A determinação do peso seco foi estabelecida assim que uma massa consistente foi alcançada.

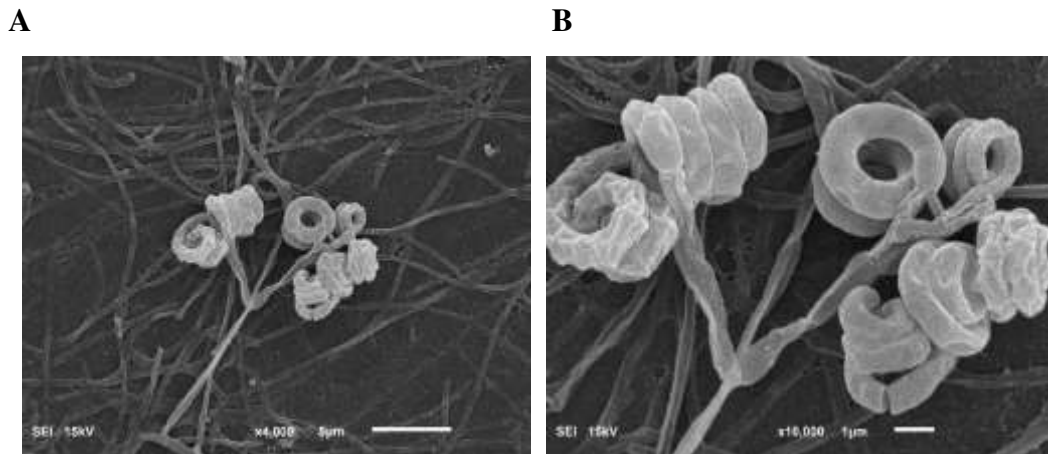
## 2.7. Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos como médias e desvios padrões dos valores obtidos de três repetições independentes. Para a análise dos dados experimentais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), utilizando o *software* GraphPad Prism V.8.0.1 (Mavrevski et al., 2018).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

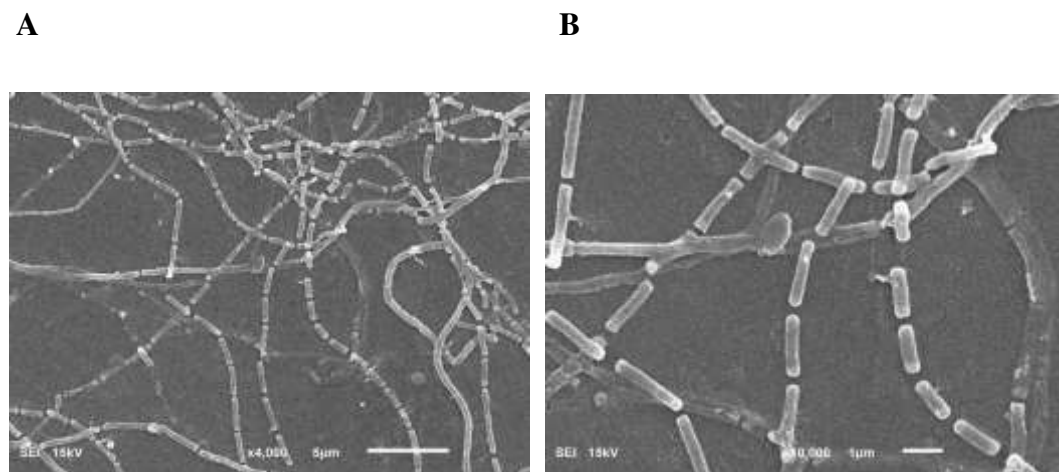
### 3.1. Caracterização das actinobactérias

Foram realizadas micrografias dos esporos das actinobactérias utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). O isolado *Streptomyces* sp. 3F apresentou os esporos organizados em forma de cilindros dispostos em espirais, com superfícies rugosas, o que pode conferir vantagem na fixação dos esporos aos substratos (Figura 1). Por exemplo, a superfície rugosa dos esporos é muito importante para a adesão inicial e desenvolvimento de biofilmes em *Aspergillus niger* (Villena; Gutiérrez-Correa, 2007). Sahin et al. (2010) também observaram que *Streptomyces* spp. isoladas do solo na Turquia exibiram esporos em cadeias espirais. Logo, essa disposição espiralada dos esporos, corrobora a sua classificação dentro deste gênero.



**Figura 1:** Micrografias do isolado *Streptomyces* sp. 3F mostrando a organização em espiral das hifas aéreas e a fragmentação em esporos cilíndricos após um período de sete dias de incubação a 28 °C em ágar ISP2. Imagens feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV, JEOL, Japão; JSM-6010LA). **B.** Ampliação 10.000x de **A.**

As micrografias dos esporos de *Lentzea* sp. 7P mostram os esporos organizados linearmente em formato de bastonetes, originados pela fragmentação das hifas vegetativas, com superfície lisa, sem projeções (Figura 2). Esses esporos representam segmentos resultantes da quebra das hifas, mantendo uma disposição linear. Idris e colaboradores (2017) isolaram uma nova linhagem do gênero *Lentzea* no norte do Chile, demonstrando que o organismo produz um micélio aéreo que se fragmenta em esporos em forma de bastonete. Nossos resultados corroboram com essas observações.



**Figura 2:** Micrografias do isolado *Lentzea* sp. 7P mostrando a fragmentação das hifas em forma de bastonetes após um período de sete dias de incubação a 28 °C em ágar ISP2. Imagens feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV, JEOL, Japão; JSM-6010LA). **B.** Ampliação 10.000x de **A.**

A morfologia dos esporos das actinobactérias desempenha um papel importante na caracterização e distinção de espécies. Atualmente, as estruturas de reprodução e as características dos esporos continuam a fornecer informações valiosas para os taxonomistas.

### 3.2. Assimilação de diferentes de fontes de carbono

Os resultados mostram que todos os isolados *Streptomyces* sp. 3F e *Lentzea* sp. 7P foram capazes de assimilar amido, galactose, inositol, celulose, xilose, manitol, sacarose, arabinose e glicose (Tabela 1, figura suplementar 1). Os resultados estão de acordo com a literatura, onde foi demonstrada a capacidade dos gêneros *Streptomyces* e *Lentzea* de metabolizar esses açúcares (Yassin *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2018).

**Tabela 1:** Assimilação de fontes de carbono pelas actinobactérias.

|                  | <i>Streptomyces</i> sp. 3F | <i>Lentzea</i> sp. 7P |
|------------------|----------------------------|-----------------------|
| <b>Amido</b>     | +                          | +                     |
| <b>Galactose</b> | +                          | +                     |
| <b>Inositol</b>  | +                          | +                     |
| <b>Celulose</b>  | +                          | +                     |
| <b>Xilose</b>    | +                          | +                     |
| <b>Manitol</b>   | +                          | +                     |
| <b>Sacarose</b>  | +                          | +                     |
| <b>Arabinose</b> | +                          | +                     |
| <b>Glicose</b>   | +                          | +                     |

### 3.3. Tolerância a cloreto de sódio e diferentes valores de pH

O crescimento das actinobactérias foi avaliado em diferentes concentrações de NaCl e valores de pH. *Streptomyces* sp. 3F demonstrou capacidade de crescimento em concentrações de 1 a 4% de NaCl, enquanto *Lentzea* sp. 7P não cresceu em condições superiores a 2% de NaCl (Tabela 2, figura suplementar 2). Quanto à tolerância ao pH, os microrganismos exibiram uma ampla faixa de adaptabilidade. Todos os isolados foram capazes de crescer em meios com pH variando de 4 a 12, exceto *Lentzea* sp. 7P, que não cresceu apenas em pH 4 (Tabela 2, figura suplementar 3). Os resultados evidenciam a capacidade dos isolados em se adaptarem às variações de pH e concentrações de NaCl, demonstrando tolerância a diversas condições ambientais. Algumas actinobactérias do gênero *Streptomyces* destacam-se por serem halotolerantes, com relatos de tolerarem até 900 mM (52,6%) de NaCl, característica útil para mitigar os efeitos adversos da salinidade para as plantas (Nongbet *et al.*, 2022).

**Tabela 2:** Tolerância das actinobactérias a diferentes concentrações de NaCl e a diferentes valores de pH.

|         | <i>Streptomyces sp. 3F</i> | <i>Lentzea sp. 7P</i> |
|---------|----------------------------|-----------------------|
| NaCl 1% | +                          | +                     |
| NaCl 2% | +                          | +                     |
| NaCl 3% | +                          | -                     |
| NaCl 4% | +                          | -                     |
| pH 4    | +                          | -                     |
| pH 6    | +                          | +                     |
| pH 7    | +                          | +                     |
| pH 8    | +                          | +                     |
| pH 10   | +                          | +                     |
| pH 12   | +                          | +                     |

#### 3.4. Síntese de enzimas de interesse agrônômico e biotecnológico

Foram realizadas análises semiquantitativas para determinar a produção de enzimas pelas actinobactérias. Um microrganismo é considerado bom produtor de enzimas quanto maior for o seu IE (Hankin; Anagnostakis, 1975). Nesse contexto, *Streptomyces sp. 3F* foi identificado como uma boa produtora de pectinase, xilanase e amilase, enquanto *Lentzea sp. 7P* demonstrou ser uma boa produtora de pectinase, xilanase e CMCCase (Tabela 3, figura suplementar 4). A produção de diversas enzimas extracelulares é uma característica muito importante para os microrganismos que habitam o solo, pois sobreviver em um ambiente com intensa competição é um desafio.

**Tabela 3:** Índice de atividade enzimática (IE) de diferentes enzimas produzidas pelas actinobactérias. Dados em média e desvio padrão.

|           | <i>Streptomyces sp. 3F</i> | <i>Lentzea sp. 7P</i> |
|-----------|----------------------------|-----------------------|
| CMCase    | 1,61 ± 0,07                | 2,24 ± 0,08           |
| Protease  | 1,37 ± 0,09                | 1,78 ± 0,09           |
| Pectinase | 3,25 ± 0,08                | 2,93 ± 0,07           |
| Amilase   | 3,7 ± 0,19                 | 1,76 ± 0,07           |
| Xilanase  | 3,54 ± 0,09                | 2,83 ± 0,12           |

Shrestha e colaboradores (2021) também avaliaram a atividade enzimática de *Streptomyces* spp. isoladas do solo florestal do Canadá, obtendo resultados positivos. Os estudos sobre produção de xilanase estão focados na aplicação agroindustrial pelo potencial biotecnológico, por exemplo, a bioconversão de resíduos agrícolas e a produção de etanol celulósico (Kumar *et al.*, 2018; EMBRAPA, 2021). A xilanase é responsável pela hidrólise completa do polissacarídeo linear  $\beta$ -1,4-xilana em compostos mais simples que são constituídos principalmente por xilose, quebrando assim a hemicelulose (Popa *et al.*, 2016).

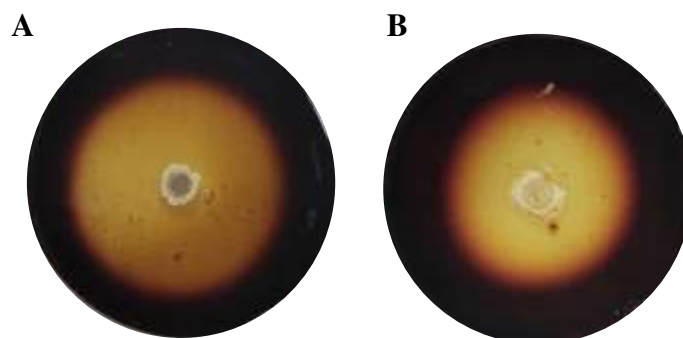
Mihajlovski e colaboradores (2021) também observaram que as cepas *Streptomyces fulvissimus* CKS7 e *S. hydrogenans* YAM1 foram capazes de crescer em meio que contém pectina, por meio da análise da hidrólise do substrato. Desse modo, a pectinase degradou a pectina do meio, um polissacarídeo complexo presente na parede celular da planta responsável pela coesão celular (Shrestha *et al.*, 2021). A pectinase é importante no processo fitopatológico, na simbiose planta-micróbio e na decomposição de material vegetal, contribuindo assim na ciclagem do carbono e também fornecendo energia e fonte de carbono para o metabolismo do microrganismo (Bonnin; Pelloux, 2020).

A produção de enzimas extracelulares pode proporcionar diversos benefícios aos sistemas agrícolas, como a melhoria da fertilidade do solo, resultando no crescimento significativo de plantas. Em geral, a produção de enzimas pode contribuir de várias maneiras para o agronegócio, como no biocontrole de fitopatógenos e pragas, degradação de subprodutos agroindustriais, entre outros.

### 3.5. Inibição de fitopatógenos

#### 3.5.1. Produção de quitinase

A produção de quitinase por actinobactérias foi avaliada também pelo método semi-quantitativo. *Streptomyces* sp. 3F mostrou um IE de  $3,12 \pm 0,07$ , enquanto *Lentzea* sp. 7P apresentou um IE de  $2,24 \pm 0,08$ . Ambos os isolados foram considerados excelentes produtores de quitinase (Figura 3).

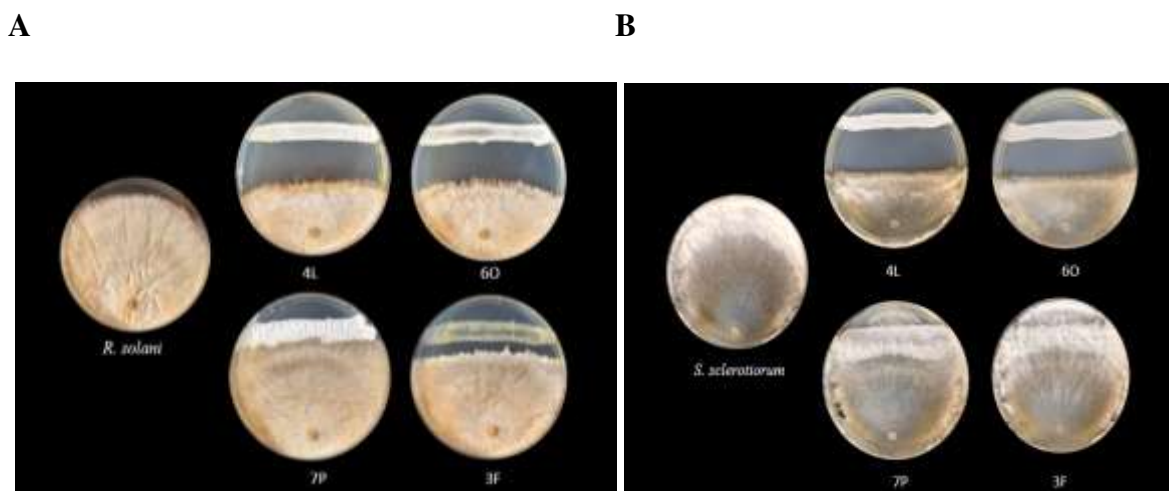


**Figura 3:** Fotografias do teste semi-quantitativo da produção de quitinase por actinobactérias. Os halos ao redor das colônias demonstram a degradação da quitina. Meio de cultivo contendo quitina coloidal como fonte de carbono. Isolados cultivados à 28 °C por 7 dias. **A:** *Streptomyces* sp. 3F. **B:** *Lentzea* sp. 7P.

No biocontrole de fitopatógenos e pragas, a quitinase é uma enzima muito importante, pois atua na degradação da parede celular de fungos e insetos, servindo como um antifúngico e bioinseticida eficaz (Gadelhak *et al.*, 2005; Ekundayo *et al.*, 2022). *Streptomyces macrosporeus* apresentou resultados promissores na otimização da produção de quitinase e em testes de antagonismo, onde essa enzima mostrou atividade inibitória contra fitopatógenos (Sukalkar *et al.*, 2018). Essas pesquisas demonstram a importância do estudo de fontes de enzimas e metabólitos secundários para serem utilizados como um mecanismo de controle biológico

### 3.5.2. Produção de compostos antimicrobianos

Foram realizados testes *in vitro* para avaliar o potencial das actinobactérias na inibição de fungos fitopatogênicos. Os resultados da cultura dupla mostraram que *R. solani* foi inibida por *Streptomyces* sp. 3F (25,5%), *Streptomyces* sp. 4L (51,25%), e *Streptomyces* sp. 6O (55,28%) e *Lentzea* sp. 7P (3,63%), em comparação ao controle (Figura 4A). Na cultura dupla com *S. sclerotiorum* observou-se inibição por *Streptomyces* sp. 4L (55,33%) e *Streptomyces* sp. 6O (52,44%), enquanto *Streptomyces* sp. 3F e *Lentzea* sp. 7P não apresentaram inibição contra o patógeno (Figura 4B). Esses resultados evidenciam o potencial de *Streptomyces* spp. na supressão do crescimento de fungos fitopatogênicos (Figura suplementar 5).



**Figura 4:** Fotografias da avaliação da atividade antagonista por meio da cultura dupla entre *Streptomyces* sp. 3F, 4L, 6O e *Lentzea* sp. 7P e os fitopatógenos. Microrganismos cultivados em meio BDA à 25 °C por 3 dias. **A.** Fitopatógeno *R. solani* e **B.** Fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

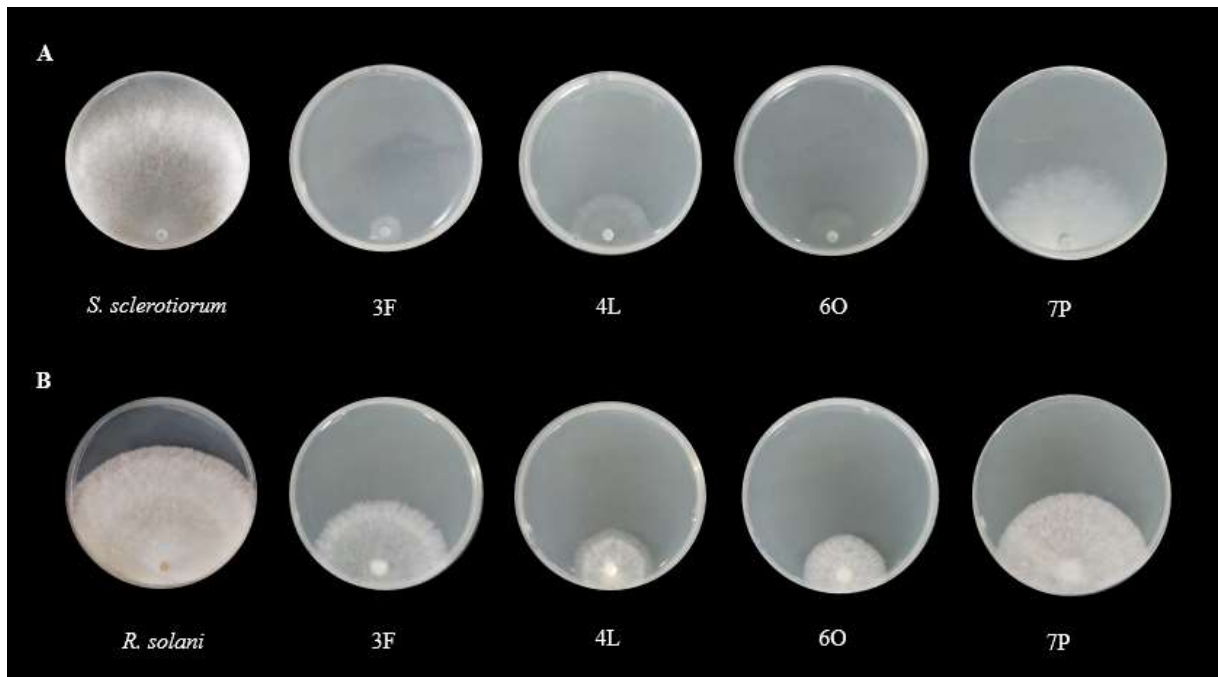
### 3.5.3. Produção de compostos orgânicos voláteis (COVs)

Os resultados mostraram que as bactérias são promissoras quanto ao controle por esses compostos voláteis. Contra o fungo do mofo-branco em soja *S. sclerotiorum*, o isolado *Streptomyces* sp. 3F apresentou 79,87% de inibição do crescimento do patógeno em relação ao controle. *Streptomyces* sp. 6O mostrou uma redução do desenvolvimento do patógeno de 72,73%, seguido por *Streptomyces* sp. 4L (67,15%) e *Lentzea* sp. 7P (63,61%) (Figura 5A). Quando os isolados foram colocados em placa selada contra o patógeno da podridão radicular e do caule em soja *R. solani*, *Streptomyces* sp. 4L apresentou uma inibição do crescimento do patógeno de 60,32% em comparação com o controle, seguido por *Streptomyces* sp. 6O (58,12%), *Streptomyces* sp. 3F (34,41%) e *Lentzea* sp. 7P (34,25%) (Figura 5B).

Os compostos orgânicos voláteis são muito interessantes, pois demonstraram associação com efeitos antifúngicos, podendo ser considerado importante para o controle biológico. Os isolados mostraram a capacidade de inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* e *R. solani* por meio desses compostos, o que está de acordo com os resultados de Boukaew e colaboradores (2021) que demonstraram a capacidade de *Streptomyces salmonis* em inibir o patógeno da antracnose (*Colletotrichum. gloeosporioides*) em frutos de pimentão por esse mecanismo.

Neste contexto, uma análise mais aprofundada de caracterização dos metabólitos orgânicos voláteis produzidos pelos isolados e sua interação com os patógenos poderia fornecer

maiores informações sobre os mecanismos inerentes ao biocontrole. A Figura 5 fornece informações por meio da visualização da supressão dos patógenos. Os resultados da inibição do desenvolvimento fúngico tanto em cultura dupla quanto em placa selada são indicativos se os isolados podem atuar como agentes de controle biológico (Figura suplementar 6).



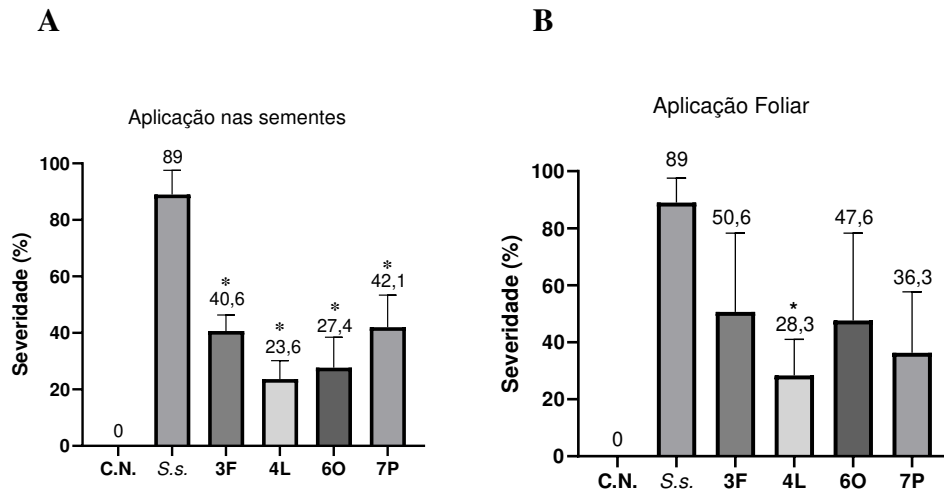
**Figura 5:** Avaliação da atividade antagonista por meio da produção de compostos voláteis entre actinobactérias (*Streptomyces* sp. 3F, 4L, 6O e *Lentzea* sp. 7P) e os fitopatógenos *S. sclerotiorum* e *R. solani*. **A:** Inibição fúngica causada pelos isolados contra *S. sclerotiorum*; **B:** Inibição fúngica do fitopatógeno *R. solani*. Microrganismos inoculados em meio BDA à 25 °C por 3 dias.

### 3.6. Potencial antagonístico *in vivo* contra patógenos da soja

Para avaliar então se os quatro isolados possuíam atividade antagonista contra os fungos patogênicos avaliados, experimentos em casa de vegetação foram conduzidos. Com base na escala de notas que considera a intensidade e o comprimento das lesões causadas por *S. sclerotiorum*, causador da doença podridão branca ou mofo-branco, as plantas foram avaliadas e o índice de doença foi calculado para aplicação das actinobactérias nas folhas e nas sementes.

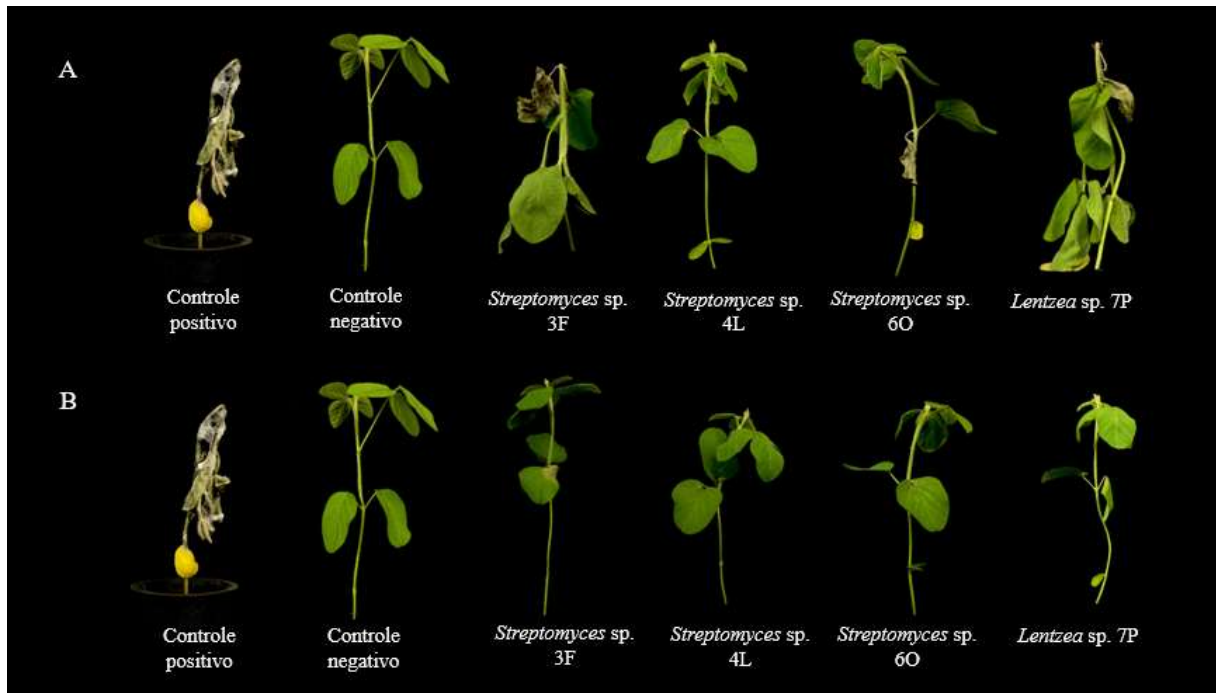
Os isolados inibiram significativamente *S. Sclerotiorum*. Plantas tratadas por aplicação nas sementes mostraram menores índices de mofo-branco. Sementes tratadas com *Streptomyces* sp. 4L apresentaram o menor índice de doença em relação ao controle positivo e entre os outros

isolados, com valor em média de 23,6%. Para o tratamento com *Streptomyces* sp. 6O, o índice de doença foi de 27,5% em média, seguido dos tratamentos com *Streptomyces* sp. 3F (40,6%) e *Lentzea* sp. 7P (42,8%) (Figura 6A). Para a avaliação da supressão do mofo-branco, os esporos dos isolados foram aspergidos nas partes aéreas onde o fitopatógeno também foi inoculado. Os resultados mostraram que o tratamento com os esporos da *Streptomyces* sp. 4L apresentou o menor índice da doença (28,3%) e foi o único com diferença estatística frente as plantas tratadas apenas com *S. sclerotiorum* (89%) ( $p < 0,05$ ) (Figura 6B).



**Figura 6:** Avaliação do efeito de actinobactérias (*Streptomyces* sp. 3F, 4L e 6O e *Lentzea* sp. 7P) na supressão do crescimento de *S. sclerotiorum* (S.s.) *in vivo*. **A:** O gráfico que representa a aplicação dos esporos nas sementes de soja; **B:** O gráfico que demonstra a aplicação dos esporos nas folhas. As barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle positivo ( $p < 0,05$ ). S.s.= *S. sclerotiorum*; C.N.= Controle Negativo.

A Figura 7 mostra a eficácia de três isolados diferentes de *Streptomyces* spp. e de um representante de gênero raro de actinobactérias, como *Lentzea* spp.



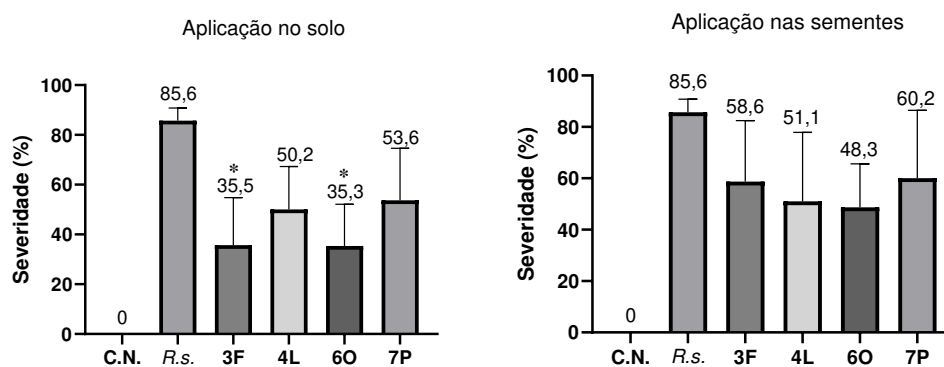
**Figura 7:** Avaliação do antagonismo *in vivo* das actinobactérias (*Streptomyces* sp. 3F, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 6O e *Lentzea* sp. 7P) a *S. sclerotiorum*. **A:** Imagens das plantas após 7 dias de inoculação do fitopatógeno e as actinobactérias inoculadas por aspersão dos esporos; **B:** Imagens das plantas após 7 dias de inoculação do fitopatógeno e as actinobactérias inoculadas nas sementes.

Os tratamentos das sementes com os esporos dos isolados não apenas demonstraram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos sintomas do mofo-branco em plantas de soja (*Glycine max*), mas também nos faz sugerir que o que esteja ocorrendo nas plantas de soja é a indução da resistência sistêmica, um possível mecanismo de biocontrole indireto (Zhang *et al.*, 2016). Em estudos anteriores do nosso grupo, *Streptomyces* sp. 4L e *Streptomyces* sp. 6O também mostraram a capacidade de induzir resistência sistêmica em plantas de tomate para o controle do nematoide de galhas (Ortiz *et al.*, 2024).

Essa eficácia é consistente com outros estudos que destacam a capacidade de actinobactérias rizosféricas no controle do mofo-branco, visto que esse fungo fitopatogênico é desafiador para diversas culturas ao redor do mundo, como tomate, feijão e soja (Elshafie; Camele, 2022; Yang *et al.*, 2023). Os nossos resultados também se amparam nos resultados de Gebily e colaboradores (2021) os quais isolaram e testaram quanto *in vitro* quanto *in vivo* três linhagens de *Streptomyces* spp. com resultados altamente eficazes para o controle do patógeno *S. sclerotiorum*.

Para as plantas tratadas com os isolados aspergidos no solo diretamente e infectadas com *R. solani*, os resultados se mostraram mais promissores, visto que o solo é um local com bastante nutriente, então as bactérias podem ter se desenvolvido melhor e atuado diretamente na supressão de *R. solani*. Assim, para *Streptomyces* sp. 3F e 6O os índices de doença foram em média de 39,8% e 38,6%, respectivamente, e com diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle positivo (*R.s.* 85,4% de índice de doença em média). Para o tratamento do solo com *Streptomyces* sp. 4L e *Lentzea* sp. 7P, os índices foram de em média 50,0% e 53,9%, respectivamente. Os resultados para esses tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas do controle positivo (Figura 8A).

Para os tratamentos onde foram colocados esporos nas sementes da soja, os resultados mostraram menos eficácia em relação ao tratamento no solo. Para *Streptomyces* sp. 6O, 4L e 3F, os índices de doença foram de 48,2%, 51,4% e 58,6% em média, respectivamente. Para o tratamento com *Lentzea* sp. 7P o índice de doença foi de 60,02%. Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle positivo (Figura 8B, figura 9).



**Figura 8:** Avaliação do efeito de actinobactérias (*Streptomyces* sp. 3F, 4L e 6O e *Lentzea* sp. 7P) na supressão do crescimento de *R. solani* (*R.s.*) *in vivo*. **A:** O gráfico que representa a aplicação dos esporos no solo; **B:** O gráfico que demonstra a aplicação dos esporos nas sementes. As barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle positivo ( $p < 0,05$ ). *R.s.*= *R. solani*; C.N.= Controle Negativo.

O fungo fitopatogênico *R. solani*, assim como *S. sclerotiorum* são importantes causadores de doenças em diversas culturas. Nossos resultados estão de acordo com os resultados de Ebrahimi-Zarandi e colaboradores (2021), onde exploraram duas espécies de *Streptomyces* spp., para controlar *R. solani* em tomateiro e que curiosamente esses isolados não apresentaram

inibição do patógeno *in vitro*, mas sim *in vivo*, o que os levaram a concluir após outros experimentos que esses isolados estavam estimulando a imunidade da planta.

Nossos resultados podem ser confirmados em experimentos futuros de expressão gênica para se avaliar a estimulação de genes relacionados à defesa da planta. Esses resultados futuros seriam de grande importância para o entendimento do mecanismo de controle que essas bactérias promissoras possuem.



**Figura 9:** Avaliação do antagonismo *in vivo* das actinobactérias (*Streptomyces* sp. 3F, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 6O e *Lentzea* sp. 7P) a *R. solani*. **A:** Imagens das plantas após 15 dias de inoculação do fitopatógeno e as actinobactérias inoculadas por aspersão dos esporos no solo; **B:** Imagens das plantas após 15 dias de inoculação do fitopatógeno e as actinobactérias inoculadas nas sementes.

### 3.7. Potencial para promover o crescimento vegetal *in vitro*

Para a avaliação foram empregados métodos qualitativos para investigar diversos aspectos do potencial promotor de crescimento de cada isolado. Analisou-se a produção de amônia, a capacidade de sintetizar AIA, a produção de sideróforos, a solubilização de fosfato e a fixação de nitrogênio. Os resultados mostram que todos os isolados foram capazes de produzir amônia, fixar nitrogênio e produzir AIA. Em particular, *Streptomyces* sp. 4L e 6O destacam-se por apresentar atividade positiva nos cinco testes realizados, demonstrando *in vitro* possuir um grande potencial para promover o crescimento vegetal. A solubilização de fosfato não foi observada em *Streptomyces* sp. 3F e *Lentzea* sp. 7P. Já a produção de sideróforos não foi observada em *Lentzea* sp. 7P, mostrando a diversificação dos mecanismos pelos quais os isolados podem promover o crescimento, uma vez que vários mecanismos diferentes podem atuar com tal propósito (Tabela 4, figura suplementar 7). Compreender esses processos é essencial, pois influenciam diretamente a disponibilidade de nutrientes para as plantas, resultando em benefícios significativos para o crescimento vegetal.

**Tabela 4:** Avaliação do potencial de promoção de crescimento vegetal *in vitro* de actinobactérias.

|                                 | <i>Streptomyces</i><br>sp. 3F | <i>Streptomyces</i><br>sp. 4L | <i>Streptomyces</i><br>sp. 6O | <i>Lentzea</i><br>sp. 7P |
|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <b>Produção de AIA</b>          | +                             | +                             | +                             | +                        |
| <b>Solubilização de Fosfato</b> | -                             | +                             | +                             | -                        |
| <b>Fixação de Nitrogênio</b>    | +                             | +                             | +                             | +                        |
| <b>Produção de Amônia</b>       | +                             | +                             | +                             | +                        |
| <b>Produção de Sideróforos</b>  | +                             | +                             | +                             | -                        |

### 3.8. Actinobactérias promovem o crescimento da soja em casa de vegetação

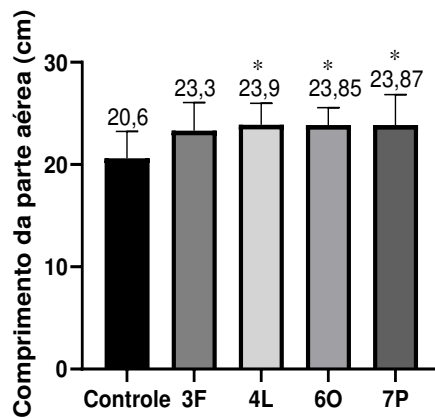
Para promoção de crescimento *in vivo*, os isolados apresentaram resultados positivos (Figura 10A). Ao analisar o comprimento da parte aérea, pode ser observado que *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 6O e *Lentzea* sp. 7P apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 10B). No que diz respeito ao comprimento da raiz, os isolados *Streptomyces* sp. 3F e 6O demonstraram resultados significativos, mostrando a capacidade de

atuação dessas actinobactérias no sistema radicular das plantas, sugerindo uma possível promoção de crescimento das raízes, contribuindo assim para absorção de nutrientes (Figura 10C). Avaliando o peso seco das raízes, nenhum isolado mostrou diferença em relação ao controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 10D). Entretanto, avaliando a massa seca da parte aérea, *Streptomyces* sp. 3F e 4L mostraram diferenças estatísticas em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 10E), indicando que os isolados não apresentam apenas influência no comprimento, mas também na biomassa da soja.

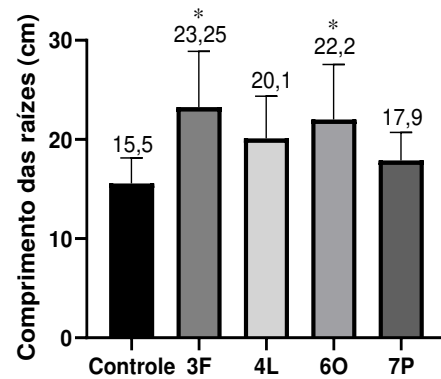
A



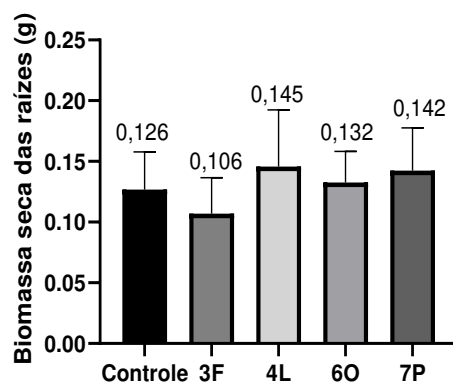
B



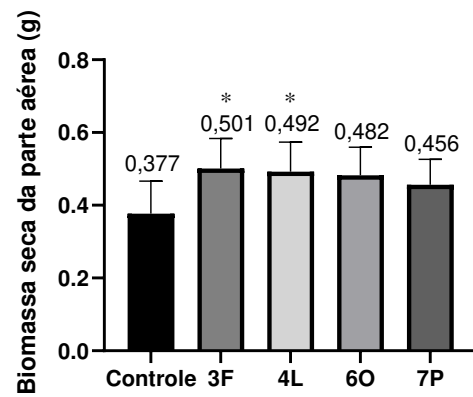
C



D



E



**Figura 10:** Avaliação do efeito de actinobactérias (*Streptomyces* sp. 3F, 4L e 6O e *Lentzea* sp. 7P) no crescimento da soja. **A:** Imagens das plantas tratadas e o controle negativo; **B, C, D e E:** Os gráficos que demonstram os

resultados quantitativos do comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, peso seco da parte aérea e peso seco da raiz. As barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos revelam que as actinobactérias apresentaram efeito promotor de crescimento que pode ser atribuído à produção de diversos metabólitos bioativos, como fitohormônios, especialmente o AIA. O AIA desempenha um papel crucial na regulação de vários processos de crescimento vegetativo, incluindo divisão celular, diferenciação e desenvolvimento radicular (Liscum; Reed, 2002). Além disso, os isolados demonstraram, *in vitro*, capacidade para promover o crescimento, envolvendo mecanismos como a produção de amônia, que desempenha um papel fundamental no estímulo ao crescimento radicular, acúmulo de fósforo e expansão da parte aérea, contribuindo para um aumento geral da biomassa vegetal. A capacidade desses microrganismos em solubilizar fosfato oferece uma alternativa interessante para disponibilizar esse mineral às plantas, assim como a conversão do nitrogênio atmosférico por meio da fixação de nitrogênio (Marques *et al.*, 2010; Amoo; Babalola, 2017).

Nos ensaios em casa de vegetação, *Streptomyces* sp. 6O se destacou por promover um aumento tanto no comprimento da raiz quanto da parte aérea das plantas. *Streptomyces* sp. 4L se destacou por aumentar o comprimento da parte aérea e também o seu peso seco. Já *Streptomyces* sp. 3F se destacou por aumentar o comprimento da raiz e também o peso seco da parte aérea. A capacidade notável das bactérias do gênero *Streptomyces* de produzir sideróforos aponta para um possível mecanismo de aumento da biodisponibilidade de ferro para as plantas, pois os sideróforos têm a capacidade de quelar íons de ferro presentes no ambiente (Lambrese *et al.*, 2018). Horstmann e colaboradores (2020) também demonstraram que *Streptomyces* sp. CLV45 produz AIA, amônia, sideróforos entre outras moléculas promotoras de crescimento de plantas. Du e colaboradores (2022) também isolaram *Streptomyces albidoflavus* St-220 da rizosfera da *Salvia miltiorrhiza* e estudaram seu potencial em promover o crescimento da sálvia e controlar a podridão radicular causada por *Fusarium oxysporum*, e concluíram que *Streptomyces* spp. é um biofertilizante promissor para uso na produção.

De acordo com os resultados desse estudo, isolados de actinobactérias melhoram o desenvolvimento da soja e suprimem patógenos importantes. Sendo assim, estudos futuros são necessários para que se possa desenvolver inoculantes baseados em actinobactérias para que aumentem a resistência das plantas para a sobrevivência em condições adversas. Além disso,

acreditamos que produtos baseados em actinobactérias podem ser usados em substituição ou para diminuição, pelo menos, do uso de produtos químicos amplamente utilizados no manejo de doenças em soja, para que as práticas agrícolas sejam mais ambientalmente sustentáveis.

#### 4. CONCLUSÕES

*Streptomyces* spp. e *Lentzea* spp. possuem um ciclo de vida complexo, passando por um processo de diferenciação morfológica, que envolve a produção de metabólitos biologicamente ativos. Seu crescimento e esporulação dependem do teor de nutrientes, fontes de carbono, faixas de pH e tolerância a NaCl. Os isolados de *Streptomyces* sp. 3F e *Lentzea* sp. 7P utilizam fontes de carbono como amido, galactose, inositol, celulose, xilose, manitol, sacarose, arabinose e glicose para seu crescimento e esporulação. O isolado *Streptomyces* sp. 3F pode tolerar pH nas faixas de 4 a 12 e tolerar o NaCl entre 1% a 4%, já o isolado *Lentzea* sp. 7P pode crescer nas faixas de 6 a 12 de pH e tolerar de 1% a 2% de NaCl, sendo estas condições ideais para aplicação em solos ao redor do Brasil.

Os isolados de *Streptomyces* sp. 3F e *Lentzea* sp. 7P produzem as enzimas extracelulares como celulase, protease, amilase, xilanase e pectinase, para a decomposição da matéria orgânica do solo, fornecendo nutrientes para seu metabolismo, e quitinases que provavelmente são responsáveis pela degradação das paredes celulares dos fungos avaliados, sendo um possível mecanismo de controle biológico. Os isolados de *Streptomyces* sp. 3F, 4L e 6O e *Lentzea* sp. 7P também devem produzir metabólitos secundários com atividade antifúngica, como mostraram os resultados dos testes de antibiose e placa selada, que devem ser alvos de caracterização e purificação em pesquisas futuras. Ainda, as avaliações feitas *in vivo* demonstraram redução de até 71,67% da severidade das doenças fúngicas avaliadas.

Os isolados de *Streptomyces* sp. 3F, 4L e 6O e *Lentzea* sp. 7P indicaram *in vitro* produzir compostos que também podem ter contribuído para o desenvolvimento das plantas, como amônia, AIA e sideróforos, além de serem capazes de fixar nitrogênio atmosférico. A inoculação dos isolados de actinobactérias em sementes de soja aumentou a biomassa das raízes e o comprimento parte aérea e das raízes das plantas de soja. Sendo assim, os isolados *Streptomyces* sp. 3F, 4L e 6O e *Lentzea* sp. 7P são microrganismos com potencial de integrarem a composição de bioinsumos futuramente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOO, A. E.; BABALOLA, O. O. Ammonia-oxidizing microorganisms: key players in the promotion of plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 935-947, 2017.
- BANDARA, A. Y. *et al.* Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. **PloS one**, v. 15, n. 4, 2020.
- BANO N.; MUSARRAT J. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. **Current Microbiology**, v. 46, p. 0324-0328, 2003.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p. 93– 108, 1994.
- BONNIN, E.; PELLOUX, J. Pectin Degrading Enzymes. In: Kontogiorgos, V. (eds) Pectin: Technological and Physiological Properties. **Springer, Cham**, 2020.
- BOUKAEW, S. *et al.* Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Streptomyces salmonis* PSRDC-09 against anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* PSU-03 in postharvest chili fruit. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 3, p. 1452-1463, 2021.
- CAPPUCCINO, J. C.; SHERMAN, N. In: Microbiology. A Laboratory manual. Boston [Massachusetts]. **Pearson Education**, p. 125-179, 2014.
- CHEN, Y. *et al.* Growth promotion and disease suppression ability of a *Streptomyces* sp. CB-75 from banana rhizosphere soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2704, 2018
- CIMERMANCIC, P. *et al.*. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 412-421, 2014.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 10, safra 2022/23, n. 3 terceiro levantamento, dezembro de 2022.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma: I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 25-39, 1971.
- DÖBEREINER, J. *et al.* Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. **Embrapa**, 1995.
- DU, Y. *et al.* Biological control and plant growth promotion properties of *Streptomyces albidoflavus* St-220 isolated from *Salvia miltiorrhiza* rhizosphere. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 976813, 2022.
- EBRAHIMI-ZARANDI, M. *et al.* Exploring two *Streptomyces* species to control *Rhizoctonia solani* in tomato. **Agronomy**, v. 11, n. 7, p. 1384, 2021.
- EKUNDAYO, F. O. *et al.* Antifungal activity of chitinase produced by *Streptomyces* species isolated from grassland soils in Futa Area, Akure. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 46, n. 1, 2022.

EMBRAPA. Xilanases microbianas e suas aplicações industriais. Documento 38. Brasília. **AGROENERGÍA**. 2021.

FAOSTAT. Crops. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. 2020.

FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 955-964, 2005.

GADELHAK, G. G.; EL-TARABILY, K. A.; AL-KAABI, F. K. Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. **International Journal Agriculture & Biology**, v. 7, n. 4, p. 627-633, 2005.

GEBILY, D. A. S. et al. Characterization and potential antifungal activities of three *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary infecting green bean. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, p. 1-15, 2021.

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

HARTMAN, G. L.; WEST, E. D.; HERMAN, T. K. Crops that feed the World 2. Soybean - worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v. 3, p. 5-17, 2011.

HORSTMANN, J. L. et al. *Streptomyces* sp. CLV45 from *Fabaceae* rhizosphere benefits growth of soybean plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1861-1871, 2020.

HOSSAIN, M. M. et al. Understanding *Phakopsora pachyrhizi* in soybean: comprehensive insights, threats, and interventions from the Asian perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 1304205, 2024.

IDRIS, H. et al. *Lentzea chajnantorensis* sp. nov., an actinobacterium from a very high altitude Cerro Chajnantor gravel soil in northern Chile. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 110, p. 795-802, 2017.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503-507, 2008.

KUMAR, S. Diseases of soybean and their management. **Crop Diseases and Their Management; Apple Academic Press: New York, NY, USA**, p. 295, 2016.

KUMAR, S. et al. Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. **3 Biotech**, v. 7, p. 1-12, 2018.

LAMBRESE, Y. et al. Production of siderophores by the bacterium *Kosakonia radicincitans* and its application to control of phytopathogenic fungi. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, p. 82-87, 2018.

LISCUM, E.; REED, J. W. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 387-400, 2002.

MARQUES, A. P. G. C. et al. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1229-1235, 2010.

- MAVREVSKI, R. *et al.* Approaches to modeling of biological experimental data with GraphPad Prism software. **WSEAS Transactions on Systems and Control**, v. 13, p. 242-247, 2018.
- MIHAJLOVSKI, K. *et al.* From agricultural waste to biofuel: Enzymatic potential of a bacterial isolate *Streptomyces fulvissimus* CKS7 for bioethanol production. **Waste Biomass**, v. 12, p. 165–174, 2021.
- MOGOLLÓN-ORTIZ, A. M. *et al.* Potential of different species of actinobacteria in the management of *Meloidogyne javanica*. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 4, p. 160, 2024.
- NAUTIYAL C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.
- NONGBET, A. *et al.* Nanofertilizers: A smart and sustainable attribute to modern agriculture. **Plants**, v. 11, p. 2587, 2022.
- NOVAKOVA, R. *et al.* The gene cluster *aur1* for the angucycline antibiotic auricin is located on a large linear plasmid pSA3239 in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. **FEMS microbiology letters**, v. 342, n. 2, p. 130-137, 2013.
- POPA, A. *et al.* Microbial xylanase: A review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 20, p. 335-342, 2016.
- PRIYA, B. S.; STALIN, T.; SELVAM, K. Efficient utilization of xylanase and lipase producing thermophilic marine actinomycetes (*Streptomyces albus* and *Streptomyces hygroscopicus*) in the production of eco-friendly alternative energy from waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 78, 2012.
- SAHIN, N. *et al.* Diversity of members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade in the legumes rhizosphere in Turkey. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 669-684, 2010.
- SATHYA, A.; VIJAYABHARATHI, R.; GOPALAKRISHNAN, S.. Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. **3 Biotech**, v. 7, p. 1-10, 2017.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.
- SHARMA, S. K.; GUPTA, G. K.; RAMTEKE, R. *Colletotrichum truncatum* [(Schw.) Andrus & WD Moore], the causal agent of anthracnose of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]—A Review. **Soybean Res**, v. 9, p. 31-52, 2011.
- SHRESTHA, S.; RAHMAN, M. S.; QIN, W. Screening and Molecular Identification of Novel Pectinolytic Bacteria from Forest Soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 9069–9087, 2021.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199-2223, 2010.

SUKALKAR, S. R.; KADAM, T. A.; BHOSALE, H. J. Optimization of chitinase production from *Streptomyces macrosporeus* M1. **Res. J. Life Sci. Bioinform. Pharm. Chem. Sci.**, v. 4, p. 106-114, 2018.

TOLÊDO-SOUZA, E. D.; COSTA, J. L. S. Inoculation methods of common bean seedlings for evaluation of germoplasm resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 33, n. 2, p. 57, 2003.

TU, J. C. Management of white mold of white beans in Ontario. *Plant Disease*, v. 3, p. 281 - 285, 1989.

VILLENA, G. K.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 231-237, 2007.

WILLBUR, J. *et al.* An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 3-11, 2019.

WOJTOWICZ, J. A. Dichlorine monoxide, Hypochlorous acid, and Hypochlorites. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, 2000.

YANG, M. *et al.* Induced Defense Response in Soybean to *Sclerotinia sclerotiorum* Using Wuyiencin from *Streptomyces albulus* CK-15. **Plant Disease**, v. 107, n. 1, p. 107-115, 2023.

YASSIN, A. F. *et al.* *Lentzea* gen. nov., a new genus of the order Actinomycetales. 1995.

ZHANG, Q. *et al.* *Streptomyces rochei* A-1 induces resistance and defense-related responses against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 115, p. 30-37, 2016.

## APÊNDICE A

A

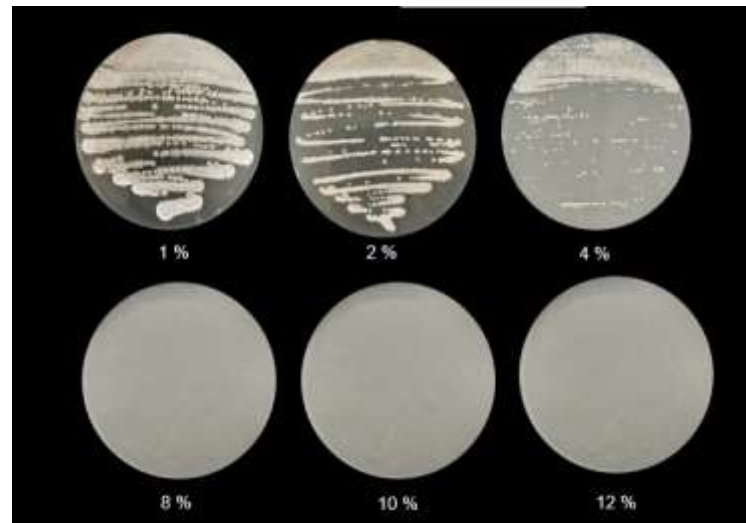


B

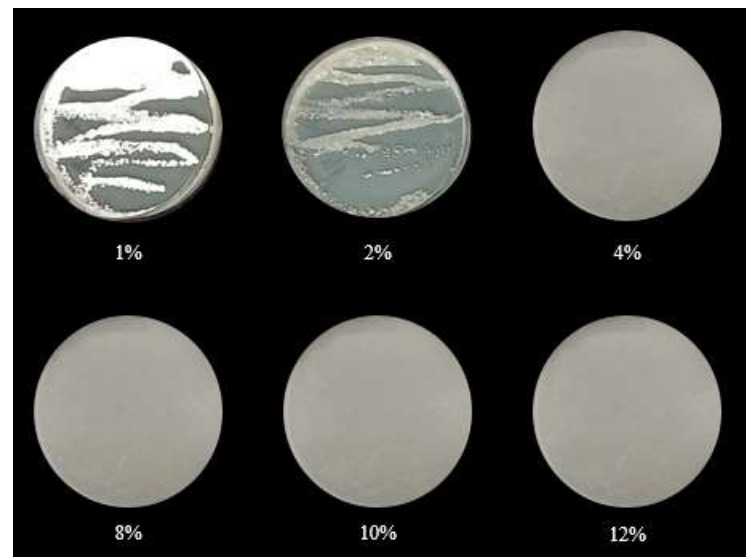


**Figura 1-** Crescimento de actinobactérias em meio mínimo basal com diferentes fontes de carbono. **A:** *Streptomyces* sp. 3F; **B:** *Lentzea* sp. 7P. As bactérias foram cultivadas durante sete dias a 28 °C em meio mínimo basal acrescido de 1% (p/v) da fonte de carbono e de soluções de sais e de vitaminas.

A

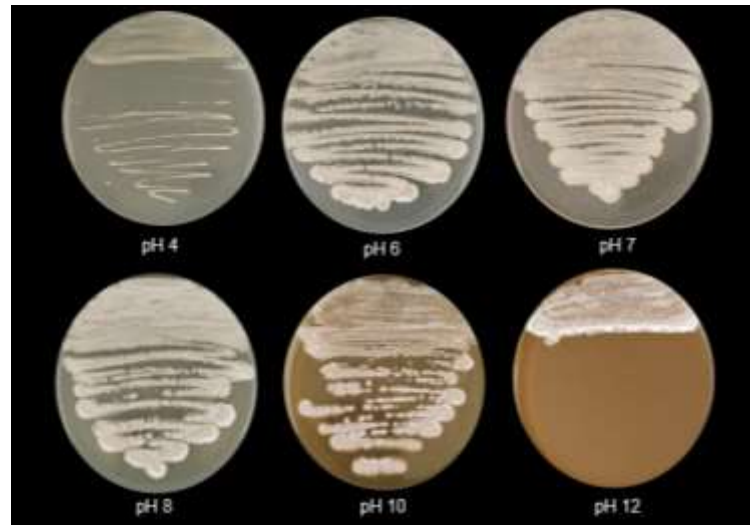


B

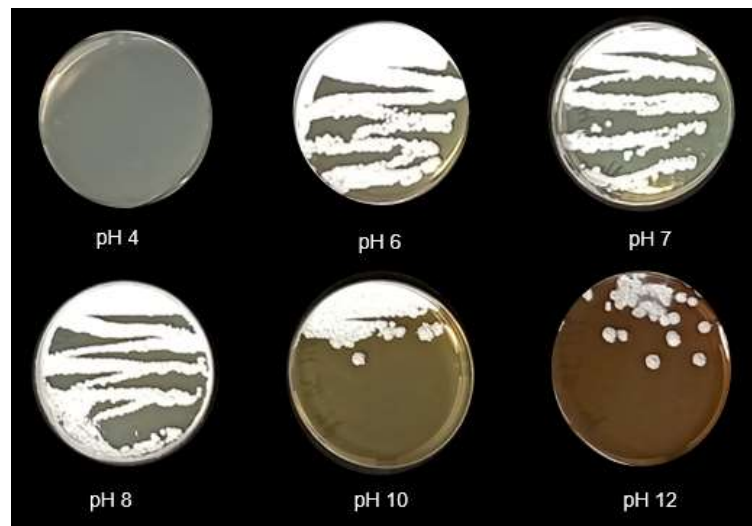


**Figura 2-** Crescimento de actinobactérias em meio de cultura basal com diferentes concentrações de NaCl. **A:** *Streptomyces* sp. 3F; **B:** *Lentzea* sp. 7P. As bactérias foram cultivadas durante sete dias a 28 °C em meio mínimo basal acrescido de NaCl.

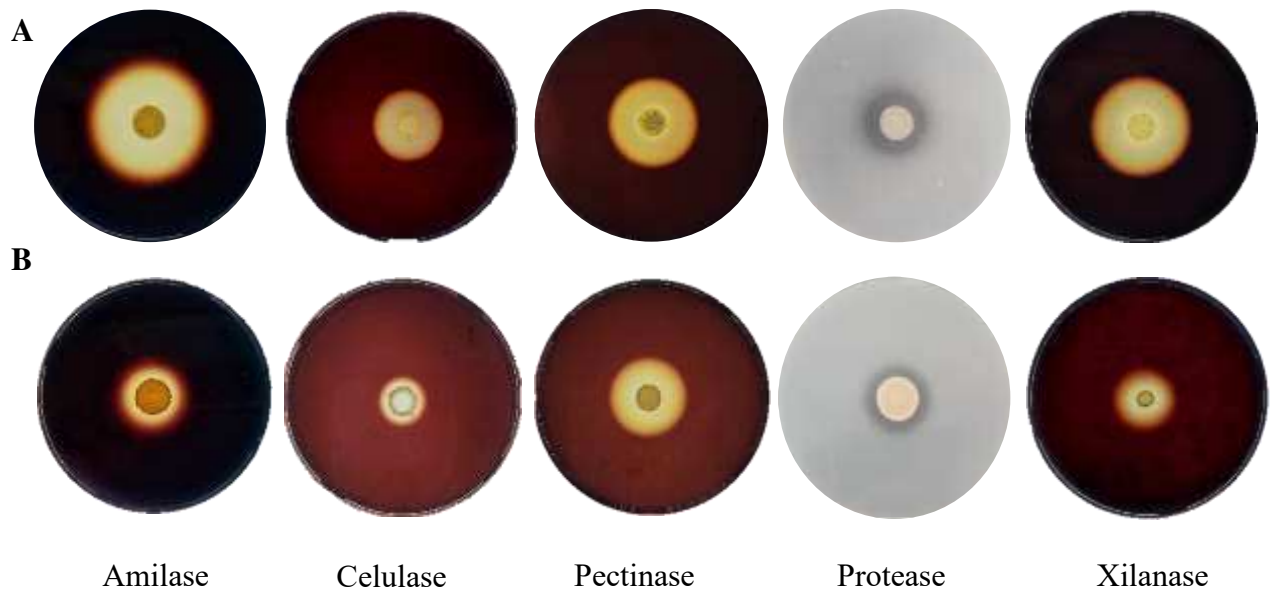
A



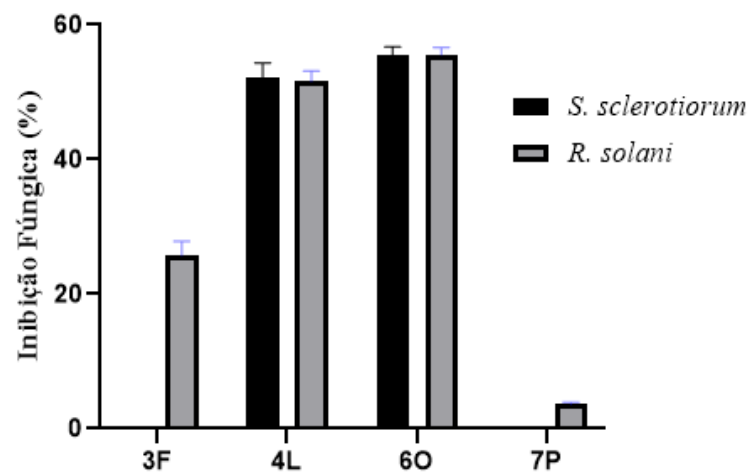
B



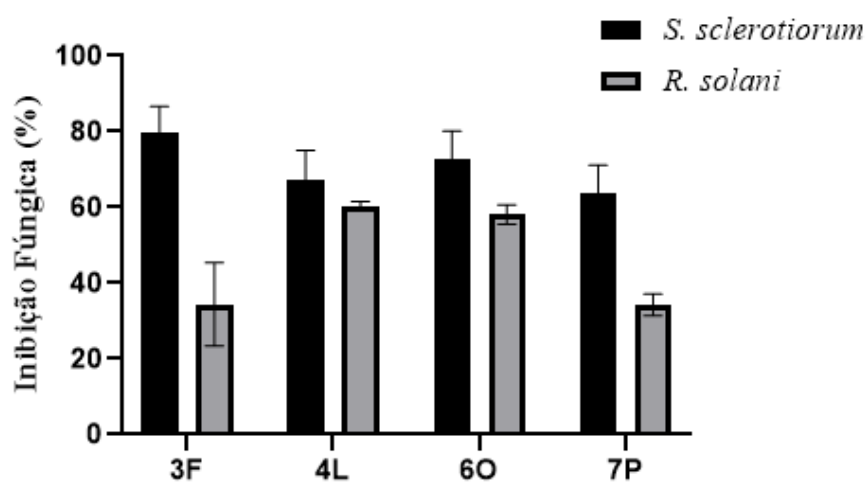
**Figura 3**– Crescimento de actinobactérias em meio de cultura basal com diferentes faixas de pH. **A:** *Streptomyces* sp. 3F; **B:** *Lentzea* sp. 7P. As bactérias foram cultivadas durante sete dias a 28 °C em meio mínimo basal.



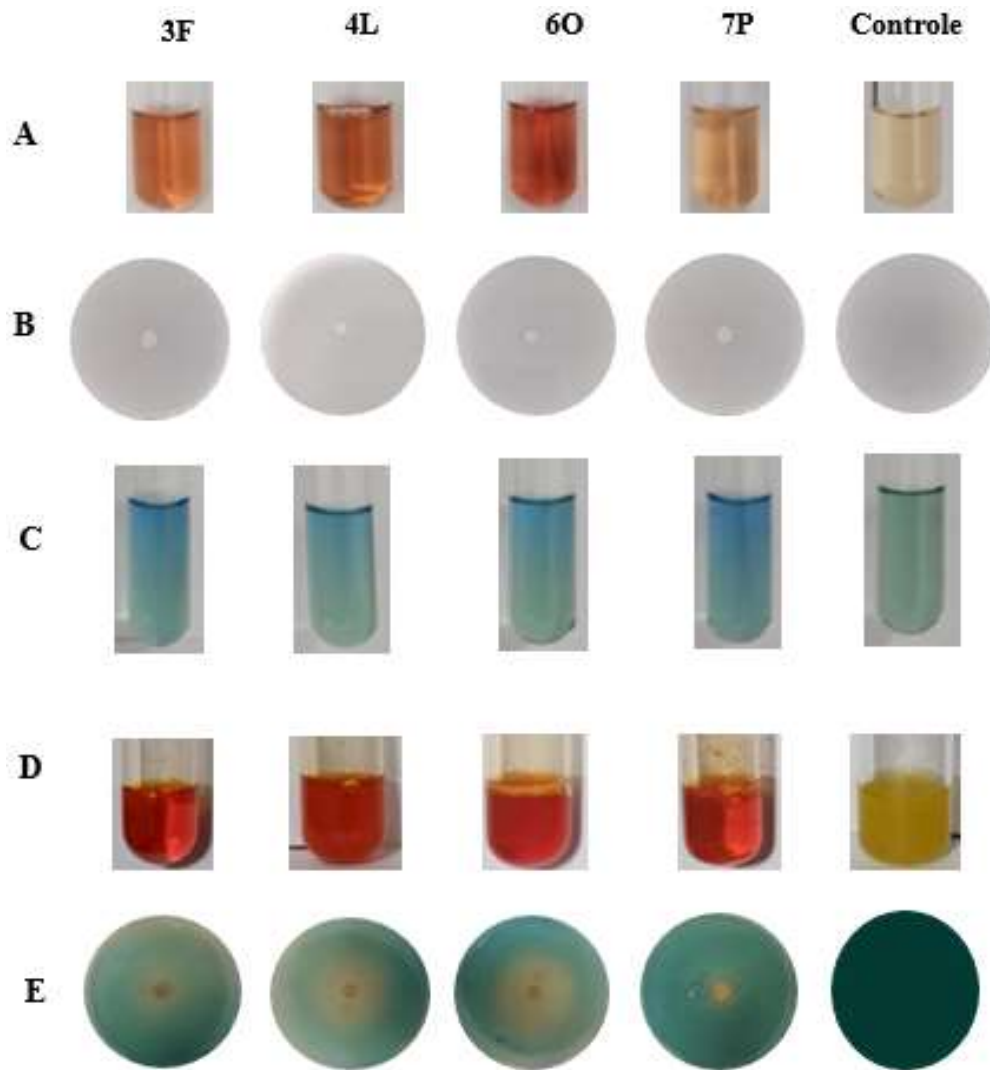
**Figura 4-** Avaliação semiquantitativa da produção de diferentes enzimas de interesse biotecnológico. **A:** *Streptomyces* sp. 3F; **B:** *Lentzea* sp. 7P.



**Figura 5:** Avaliação da atividade antagonista Cultura Dupla entre actinobactérias (*Streptomyces* sp. 3F, 4L, 6O e *Lentzea* sp. 7P) e os fitopatógenos *S. sclerotiorum* e *R. solani*. O gráfico apresenta a atividade antagonista dos isolados. As barras no gráfico representam a média da porcentagem de inibição. O erro padrão é indicado por barras no gráfico.



**Figura 6:** Avaliação da atividade antagonista dos compostos voláteis entre actinobactérias (*Streptomyces* sp. 3F, 4L, 6O e *Lentzea* sp. 7P) e os fitopatógenos *S. sclerotiorum* e *R. solani*. O gráfico apresenta a atividade antagonista dos isolados em testes em placas seladas. As barras no gráfico representam a média da porcentagem de inibição. O erro padrão é indicado por barras no gráfico.



**Figura 7:** Avaliação de indicadores de promoção de crescimento *in vitro* de *Streptomyces* sp. 3F, 4L, 6O e *Lentzea* sp. 7P. **A:** Produção de ácido indol acético; **B:** Solubilização de fosfato; **C:** Fixação de nitrogênio; **D:** Produção de amônia; **E:** Produção de sideróforos.