

RITA DE CÁSSIA CERQUEIRA MELO

**MICROBIOTA DO SOLO DE BANANEIRA COMERCIAL E DO COMPOSTO
ORGÂNICO, ISOLAMENTO DE ACTINOBACTÉRIAS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

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

Orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli

Coorientadoras: Maria Catarina Megumi Kasuya
Cynthia Canêdo Da Silva
Marisa Vieira De Queiroz

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

T

M528m
2019

Melo, Rita de Cássia Cerqueira, 1988-

Microbiota do solo de bananeira comercial e do composto orgânico, isolamento de actinobactérias e avaliação do potencial biotecnológico / Rita de Cássia Cerqueira Melo. – Viçosa, MG, 2019.

126f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Denise Mara Soares Bazzolli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

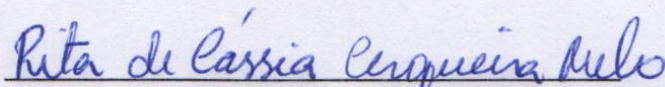
1. Micro-organismos - Controle. 2. Ecologia microbiana.
3. Compostagem. 4. Banana - Cultivo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Meteorologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579

**MICROBIOTA DO SOLO DE BANANEIRA COMERCIAL E DO COMPOSTO
ORGÂNICO, ISOLAMENTO DE ACTINOBACTÉRIAS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

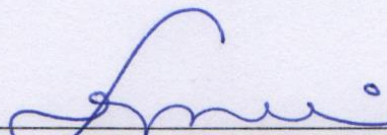
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 27 de fevereiro de 2019.



Rita de Cássia Cerqueira Melo

Autora



Denise Mara Soares Bazzolli

Orientadora

À toda minha família, em especial aos meus pais, que sempre foram e sempre serão a minha fonte inesgotável de inspiração; aos amigos, orientadores e professores que, de alguma maneira, me impulsionaram até aqui!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, Ele sabe o porquê;

Aos meus pais, Vera e João, pela vida, por todos os ensinamentos, amor e cuidado, por literalmente tudo. E a todos da minha família, meus irmãos... pelos momentos compartilhados presencialmente ou não, pelo apoio e amor de sempre;

Aos amigos da Bahia, que mesmo de longe me incentivaram e foram importantes nesse meu período aqui em Viçosa, inclusive nessa reta final;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos transmitidos;

À Universidade Federal de Viçosa pela estrutura física e oportunidade de fazer parte do corpo discente desta Universidade;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de doutorado. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro;

À Empresa Sítio Barreiros LTDA pela parceria e por conceder as amostras de solo e compostagem utilizadas neste trabalho e, em especial, ao Vagner e Fabrício que foram fundamentais para o trabalho em casa de vegetação;

Ao Programa de Microbiologia Agrícola pela oportunidade de fazer parte de um dos melhores cursos de pós-graduação em microbiologia do país e pelo auxílio estrutural para o desenvolvimento deste trabalho;

Às professoras Denise Bazzolli e Maria Catarina Kasuya pela oportunidade de trabalhar nestes quatro anos com este projeto, o qual tive prazer em desenvolver. E por toda orientação, sugestões, correções, cooperação e apoio nesse período;

Às professoras Marisa Queiroz e Cynthia Canedo pela coorientação, pelas ideias, correções e por sanar dúvidas sempre que precisei;

Ao professor Luiz Carlos Chamhum Salomão pelas dicas no experimento na casa de vegetação;

Ao Tomás Veloso e ao Cristhian Grabowski pela ajuda em bioinformática e fitopatologia, além das conversas e dicas sempre muito importantes, e ao prof.º Lucas Abreu pelas dicas em filogenia;

Ao Tiago Laje, Fernando Freitas e Nívea Vieira pela ajuda na liofilização das amostras;

Aos membros da banca pela disponibilidade e pela contribuição no trabalho;

A todos dos laboratórios de Genética Molecular de Bactérias, Genética Molecular de Fungo

e de Associações Micorrízicas pela ajuda em determinados momentos, pelos conhecimentos transmitidos e compartilhados, companheirismo, além de todos os momentos de distração; vocês são muito especiais. Não vou citar nomes, pois considero muitos especiais e importantes;

Aos técnicos Jaqueline, Camila, Elizete e Antônio Carlos, sempre muito prestativos e eficientes, além de “Seu” Paulo da cozinha, Célio e Emília do almoxarifado e, “Seu” Paulo e Robson da portaria do BioAgro. E à Nilcéa e Letícia, secretárias da pós-graduação, pela eficiência e dedicação sempre.

Aos amigos baianos encontrados e reencontrados aqui em Viçosa;

Aos amigos conquistados aqui em Viçosa, que me acolheram super bem desde o momento em que cheguei aqui e que foram fundamentais nesse período, por todos os momentos, viagens e experiências maravilhosas compartilhadas;

A todos que direta e/ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

*Nunca se limite ao que lhe é oferecido,
esteja sempre disposto a explorar.*

RESUMO

MELO, Rita de Cássia Cerqueira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Microbiota do solo de bananeira comercial e do composto orgânico, isolamento de actinobactérias e avaliação do potencial biotecnológico.** Orientadora: Denise Mara Soares Bazzoli. Coorientadoras: Maria Catarina Megume Kasuya, Cynthia Canêdo da Silva e Marisa Vieira de Queiroz.

A bananicultura é uma prática de grande importância socioeconômica difundida mundialmente, e a rizosfera de bananeiras pode apresentar microrganismos benéficos à cultura, bem como fitopatógenos. Da mesma forma, sistemas de compostagens podem veicular microrganismos benéficos e ou indesejáveis para o solo de plantios agrícolas, no processo de adubação. Neste contexto, o primeiro capítulo tem o objetivo de analisar a estrutura e diversidade de bactérias e fungos de solo sob cultivo de bananeira de plantio comercial em dois Estados Brasileiros, Bahia e Ceará, e das fases de um sistema de compostagem; no segundo capítulo, considerando o filo Actinobacteria um dos mais abundantes nestes ambientes, região rizosférica e sistema de compostagem, e com expressivo potencial biotecnológico já descrito, o objetivo foi isolar e identificar actinobactérias e avaliar o seu potencial biotecnológico no controle *in vitro* de fungos e bactérias patogênicas; e, no terceiro capítulo, a partir dos resultados do capítulo dois, o objetivo foi avaliar *in vivo* o efeito de bactérias do gênero *Streptomyces* na promoção do crescimento vegetal de bananeira e na supressão da doença mal-do-Panamá, doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, uma das mais importantes doenças da bananeira. Com o resultado das análises de bioinformática, na abordagem independente de cultivo deste trabalho referente ao capítulo um, foi possível observar diferenças na composição taxonômica e abundância de grupos microbianos nas amostras dos dois Estados e nas quatro fases da compostagem. Na abordagem dependente de cultivo, capítulo dois, 62 actinobactérias foram isoladas e identificadas por características morfológicas/culturais e pelo sequenciamento parcial do gene DNAr 16S. A fim de verificar o potencial antagonista *in vitro*, os 62 de actinobactérias foram avaliados pelo teste de pareamento de culturas contra três fungos filamentosos: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), *Fusarium oxysporum* (FO) e *Colletotrichum lindemuthianum* (CL). Doze isolados inibiram *Foc*, 11 inibiram o FO e 44 inibiram o CL, sendo que 10 isolados apresentaram atividade antagonista contra os três fungos filamentosos. Os metabólitos produzidos pelos 12 isolados que inibiram *Foc*, incluindo os 10 isolados que

inibiram os três fungos filamentosos, foram liofilizados e avaliados pelo teste de difusão em disco de papel. O extrato de um isolado apresentou atividade contra *Candida albicans*, cinco apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e sete contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Em testes com mudas de bananeira da variedade Prata anã, capítulo três, os 12 isolados promissores para o controle de *Foc* foram testados *in vivo* em condições de casa de vegetação, para avaliação do potencial na promoção do crescimento vegetal de bananeira, bem como na supressão da doença mal-do-Panamá. As plantas tratadas com o isolado CAB-C 50 mostraram um maior desenvolvimento, diferindo dos demais tratamentos em função das diferentes variáveis avaliadas: altura da planta, diâmetro do pseudocaule, número de folhas, massa fresca, massa seca ($p < 0,01$ e $0,001$). Na supressão da doença, os tratamentos com os isolados CAB-C 12, CAB-C 21, CAB-C 24, CAB-C 25 e CAB-C 50 foram os que mais diferiram do controle *Foc*, sendo os tratamentos com os isolados CAB-C 12 e CAB-C 50 os mais promissores. Um consórcio composto por quatro diferentes isolados *Streptomyces* sp., os mais promissores para o controle do *Foc* em teste *in vitro*, mostrou-se eficiente para a redução da doença no período avaliado. Assim, com este trabalho, foi possível verificar diferenças na composição microbiana (bactérias e fungos) em solos sob cultivo de bananeira e em composto maduro (fase IV da compostagem) e que existem actinobactérias com potencial para o controle de microrganismos patogênicos (fungos filamentosos e leveduriformes; e bactérias Gram negativas e Gram positiva) bem como potenciais agentes de promoção do crescimento vegetal de mudas de bananeira da variedade Prata anã.

Palavras-chave: Agricultura. Actinomicetos. Controle Biológico. Antibiose. Promoção de crescimento.

ABSTRACT

MELO, Rita de Cássia Cerqueira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Microbiota of commercial banana soil and organic compound, isolation of actinobacteria and evaluation of biotechnological potential.** Advisor: Denise Mara Soares Bazzoli; Co-advisers: Maria Catarina Megume Kasuya, Cynthia Canêdo da Silva and Marisa Vieira de Queiroz.

Banana cultivation is a worldwide widespread practice of great socioeconomic importance, and the rhizospheric region of banana trees may present microorganisms beneficial to the crop, as well as phytopathogens. Similarly, composting systems can carry beneficial and undesirable microorganisms to the soil of agricultural crops in the fertilization process. In this context, the first chapter aims to analyze the structure and diversity of soil bacteria and fungi under commercial banana cultivation in two Brazilian States, Bahia and Ceara, and the phases of a composting system; in the second chapter, considering the phylum Actinobacteria one of the most abundant in these environments, rhizospheric region and composting system, and with significant biotechnological potential already described, the objective was to isolate and identify actinobacteria and evaluate its biotechnological potential in the control of fungi and bacteria pathogenic *in vitro*; and, in the third chapter, from the results of chapter two, the objective was to evaluate *in vivo* the effect of bacteria of the genus *Streptomyces* on the promotion of banana plant growth and on the suppression of Panama disease, disease caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, one of the most important banana diseases. With the results of bioinformatics analyzes, in the culture independent approach of this work, referring to chapter one, it was possible to observe differences in the taxonomic composition and abundance of microbial groups in the samples from both States and in the four composting phases. In the culture-dependent approach, chapter two, 62 actinobacteria were isolated and identified by morphological / cultural characteristics and partial sequencing of the 16S rDNA gene. In order to verify the potential antagonist *in vitro*, 62 actinobacteria were evaluated by culture pairing test against three filamentous fungi: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), *Fusarium oxysporum* (FO) and *Colletotrichum lindemuthianum* (CL). Twelve isolates inhibited *Foc*, 11 inhibited FO and 44 inhibited CL, and 10 isolates showed antagonistic activity against the three filamentous fungi. The metabolites produced by the 12 isolates that inhibited *Foc*, including the 10 isolates that inhibited the three filament fungi, were lyophilized and evaluated by the paper disk diffusion test. The extract of one isolate

showed activity against *Candida albicans*, five showed activity against *Staphylococcus aureus* and seven against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In trials with Banana seedlings "Prata ana", chapter three, the 12 promising isolates for *Foc* control were tested *in vivo* under greenhouse conditions to evaluate the potential for promoting banana plant growth, as well as for suppressing of the Panama disease. The plants treated with CAB-C 50 isolate showed higher development, differing from the other treatments from the different evaluated variables: plant height, pseudostem diameter, leaf number, fresh mass, dry mass ($p < 0.01$ and 0.001). In the disease suppression, treatments with CAB-C 12, CAB-C 21, CAB-C 24, CAB-C 25 and CAB-C 50 isolates differed most from the *Foc* control, with the most promising treatments being the isolates CAB-C 12 and CAB-C 50. A consortium composed by four different *Streptomyces* sp. isolates, the most promising for *in vitro* *Foc* control, proved to be efficient for the reduction of the disease in the evaluated period. Thus, with this work, it was possible to verify differences in microbial composition (bacteria and fungi) in rhizospheric soils of banana cultivation in two Brazilian States, as well as of a composting system and, both in the mature compost (phase IV composting) and in in soils under banana cultivation there are actinobacteria with potential for the control of pathogenic microorganisms (filamentous and yeast fungi; and Gram negative and Gram positive bacteria) as well as for the promotion of plant growth of banana plants (Prata anã).

Keywords: Agriculture. Actinomycetes. Biological control. Antibiosis. Growth promotion.

SUMÁRIO

Introdução Geral	13
Capítulo 1	17
Resumo	17
1. Introdução	19
2. Material e Métodos	21
2.1. <i>Coleta das amostras</i>	21
2.2. <i>Extração de DNA e sequenciamento MiSeq</i>	22
2.3. <i>Análises de bioinformática</i>	22
2.4. <i>Análises estatísticas</i>	23
3. Resultados	24
3.1. <i>Composição taxonômica das amostras</i>	24
3.2. <i>Detecção de gêneros microbianos benéficos à cultura de bananeira</i>	26
3.3. <i>Índices de diversidade microbiana</i>	28
3.4. <i>Análise multivariada</i>	30
4. Discussão	31
5. Conclusões	35
6. Referência	36
7. Apêndices	42
Capítulo 2	48
Resumo	48
1. Introdução	49
2. Material e Métodos	51
2.1. <i>Amostragem e isolamento de actinobactérias</i>	51
2.2. <i>Caracterização morfológica</i>	52
2.3. <i>Extração de DNA, PCR do DNAr 16S</i>	52
2.4. <i>Identificação molecular e análise filogenética</i>	53
2.5. <i>Atividade antagonista</i>	53
2.5.1. <i>Microrganismos teste utilizados</i>	53
2.5.2. <i>Atividade antifúngica</i>	54
2.5.3 <i>Teste de inibição da germinação de conídios de FOC por difusão de metabólitos em meio de cultura</i>	55

2.5.4 Obtenção do extrato bruto	55
2.5.5 Teste de disco-difusão	56
3. Resultados	57
3.1. Isolamento, identificação e caracterização dos isolados	57
3.2. Construção da árvore filogenética	59
3.3. Atividade antagonista dos isolados	61
3.3.1. Teste de pareamento de cultura <i>in vitro</i>	61
3.3.2. Teste de germinação de conídios com <i>Foc</i> por difusão de metabólitos.....	63
3.3.3. Teste com o extrato bruto.....	67
4. Discussão	69
5. Conclusões	73
6. Referências	73
7. Apêndices	80
Capítulo 3	93
Resumo	93
1. Introdução	94
2. Material e métodos	96
2.1. Isolados utilizados	96
2.2. Preparo do substrato e do solo para transplante das mudas	97
2.3. Obtenção das mudas de bananeira e transplante.....	97
2.4. Preparo do inóculo bacteriano e inoculação	99
2.5. Preparo do inóculo fúngico e inoculação.....	99
2.6. Montagem dos experimentos	99
2.7. Avaliação da promoção do crescimento vegetal	100
2.8. Avaliação da supressão da doença mal-do-Panamá.....	101
3. Resultados	103
3.1. Promoção do crescimento de bananeiras.....	103
3.2. Controle da doença mal-do-Panamá.....	104
3.2.1. Efeito das bactérias do gênero <i>Streptomyces</i> na supressão da doença mal-do-Panamá.....	104
3.2.1. Desenvolvimento das plantas	109

4. Discussão	110
5. Conclusões.....	113
6. Referências.....	114
7. Apêndices	119
Conclusões Gerais.....	126

Introdução Geral

A microbiota, conjunto de microrganismos de um determinado hábitat, incluindo bactérias, fungos, vírus, arqueias, protozoários e vírus (Bulgarelli et al., 2013; Mueller & Sachs, 2015), tem sido bastante estudada ao longo dos últimos anos em diferentes ambientes. A investigação independente de cultivo, tem permitindo uma maior abrangência e, conseqüentemente, maior representatividade da estrutura e da diversidade de comunidades microbianas do solo, o que tem ajudado no entendimento do funcionamento do sistema solo-planta-microrganismo, permitindo interferência em busca de melhorias econômicas e ambientais (Mande et al., 2012; Finley et al., 2015).

Vários fatores influenciam na distribuição das comunidades microbianas no solo, como por exemplo, a disponibilidade de nutrientes, tipo e propriedades do solo, condições climáticas (precipitação e temperatura) do ambiente, manejo do solo e da cultura vegetal, bem como pelo genótipo e idade da planta (Philippot et al., 2013; Yang et al., 2016; Steinauer et al., 2016; Andreote & Silva, 2017). Na agricultura, a prática do monocultivo é um fator determinante do *core* microbiano da região rizosférica, tanto no que se refere à estrutura quanto à diversidade destas comunidades microbianas, quando comparado a um sistema de plantio misto de genótipos (Philippot et al., 2013; Steinauer et al., 2015; Steinauer et al., 2016; Andreote & Silva, 2017).

Bactérias são as formas de vida mais abundantes no solo, compreendendo cerca de 95% do total, e podem apresentar comportamentos positivos, negativos ou neutros em relação às plantas por elas circundadas (Glick, 2012). No contexto da agricultura sustentável, as bactérias do solo têm ganhado destaque ao longo dos anos em detrimento aos demais grupos de microrganismos, desempenhando um papel essencial na proteção da planta contra patógenos, conferindo vantagens adaptativas, como também atuando na promoção do crescimento, saúde e produtividade vegetal (Haney et al., 2015; Berg et al., 2016; Orozco-Mosqueda et al., 2018).

O uso de microrganismos na promoção do crescimento vegetal e controle de doenças, é uma alternativa ao uso de agroquímicos, reduzindo o impacto ambiental gerado pela aplicação destes no ambiente (Palaniyandi et al., 2013; Ohike et al., 2018). Neste contexto, o filo Actinobacteria, o qual é um dos mais abundantes em solos rizosféricos, composto por bactérias Gram positivas com muitas espécies descritas com potencial biotecnológico,

representa o grupo de microrganismo com maior produção de metabólitos secundários até então conhecido e, na agricultura, com relatos da sua atuação na promoção do crescimento vegetal e controle de fungos fitopatogênicos (Hamedi et al., 2015).

Pertencente ao filo Actinobacteria, as bactérias do gênero *Streptomyces* são potências atuantes nesse cenário, tanto na promoção do crescimento vegetal, quanto no controle de patógenos e, nos últimos anos, tem sido relatada uma maior participação de bactérias deste gênero como PGP, podendo apresentar diferentes mecanismos, tais como: alívio do estresse da planta, pela produção da enzima 1-aminociclopropano carboxilato desaminase (ACC); produção de hormônios, como o ácido indolacético (AIA); produção de sideróforos; solubilização de fosfato; e por promover/auxiliar a simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos, além da produção de diferentes enzimas que podem atuar na degradação de complexos nutricionais no solo tornando-os assimiláveis pela planta (Palaniyandi et., 2013; Dias et al., 2017; Vurukonda et al., 2018). Bactérias do gênero *Streptomyces* apresentam também um eficiente sistema secretor que, no contexto ecológico, atuam na regulação da captação de nutrientes, expulsão de toxinas e liberação de enzimas que quebram material vegetal e animal, tornando-os absorvíveis pelas suas hifas e também pelas plantas e, em condições de estresse no solo, elas utilizam um mecanismo de morte celular programada para permitir a sua sobrevivência em condições limitantes (Kemung et al., 2018).

Fatores abióticos, como sistema de irrigação, tratos culturais, uso de fertilizantes, pesticidas e condições ambientais podem, além de afetar a microbiota do solo, refletir tanto na fitossanidade de plantios agrícolas quanto nos custos de produção (Wairegi et al., 2010, Wang et al., 2013), embora sejam os fatores bióticos, as doenças especificamente, que apresentam danos mais significativos e preocupantes para a produção de banana, por exemplo (Cordeiro & Matos, 2012; Ploetz et al., 2015a). A bananeira é uma cultura com elevada exigência nutricional, tanto por produzir grande massa vegetativa, como também pela elevada absorção de elementos pela planta e exportação para os frutos (Borges et al., 2016). E, a prática do monocultivo, com a remoção das diferentes espécies vegetais nativas, associada ao esgotamento de nutrientes e ao uso de agroquímicos (fertilizantes, corretivos, pesticidas) há uma acentuada degradação do solo, acarretando em um estado debilitado da planta, diminuindo a produtividade e também, favorecendo o desenvolvimento de doenças

(Borges, 2012; Ploetz, 2015; Borges et al., 2016).

Uma espécie fúngica de grande importância para culturas agrícolas é *Fusarium oxysporum*, o qual apresenta uma reprodução predominantemente assexuada, sendo as linhagens clonais consideradas como um “complexo de espécies”, dentre os quais há microrganismos com especificidade com determinados hospedeiros, sendo chamados de *formae speciales* (Michielse & Rep, 2009; Ploetz et al., 2015a). A *formae speciales* do *F. oxysporum* que afeta a cultura da bananeira é a *cubense* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* - *Foc*), agente etiológico da doença mal-do-Panamá, fungo considerado global, por estar presente em todas as áreas produtoras de banana, um patógeno necrotrófico e hemibiotrófico por apresentar fases de infecção e sobrevivência em células vivas da planta hospedeira, bem como pode sobreviver em material vegetal em decomposição (Wang et al., 2013; Ploetz et al., 2015a; Dita, 2018).

O *Foc* é subdividido em quatro raças fisiológicas: raça 1, tem como hospedeiras as variedades Gros Michel, Prata anã e Maçã, raça 2, afeta as bananeiras do genótipo ABB como a variedade Bluggoe e a raça 4, a qual ainda não está presente nas américas, mas é uma impactante ameaça, uma vez que todas as variedades plantadas são suscetíveis a tal raça, sendo subdividida em *Subtropical raça 4 - SR4*, que afeta as variedades do subgrupo Cavendish e *Tropical race 4 - TR4* que afeta muitas das mesmas variedades afetadas pela raça SR4, embora a diferença esteja nos locais de ocorrência, diretamente relacionado com as condições climáticas (Pietro et al., 2003; Ploetz et al., 2015a; Cordeiro et al., 2016; Dita et al., 2018(a)). Estas raças fisiológicas causam doenças em diferentes variedades de bananeiras, muitas destas variedades de grande importância econômica, tanto para pequenos agricultores quanto para exportação e, até então, não há formas efetivas de controle a longo prazo (Stover, 1962; Wang et al., 2013; Ploetz et al., 2015a; Panama Disease, 2016).

No Brasil, muitas das variedades mais cultivadas são suscetíveis ao mal-do-Panamá, tais como a Prata, Prata anã, Pavocan, Fhia 18, Pioneira, Gros Michel e a Maçã que é uma variedade altamente suscetível ao mal-do-Panamá (Cordeiro & Matos, 2012; Cordeiro et al., 2016). No entanto, existem algumas variedades que apresentam resistência a tal doença, tais como: às pertencentes ao grupo AAA (Nanica, Nanicão, Grande Naine, Prata Baby e Caipira), ao grupo AAB (Terra, Terrinha, D'Angola e Thap Maeo), e ao grupo AAAB (Pacovan Ken, Prata Graúda, Maravilha, Vitória e Japira) (Cordeiro & Matos, 2012; Silva et

al., 2016).

Assim, no capítulo 1 são analisadas as diferenças na estrutura e diversidade de comunidades bacterianas e fúngicas de solo sob cultivo de bananeira de plantios comerciais em dois Estados do Nordeste Brasileiro, bem como nas quatro fases de um sistema de compostagem, em que o composto maduro é utilizado para adubação do solo. E, a partir disso, nas análises do capítulo 2 são realizados isolamentos de actinobactérias de amostra de solo sob cultivo de bananeira e do composto maduro (fase IV da compostagem) e avaliação do potencial para o biocontrole de microrganismos patogênicos. Os isolados promissores obtidos no capítulo 2 para o controle biológico do *Foc*, são utilizados em testes em casa de vegetação para avaliação da atuação na supressão da doença mal-do-Panamá, causada por *Foc*, bem como na promoção do crescimento vegetal de bananeiras da variedade Prata anã no capítulo 3.

Capítulo 1

Microbiota associada à rizosfera de bananeira comercial e ao composto orgânico utilizado para adubação

Resumo

A composição e abundância da microbiota rizosférica são influenciadas por diversos fatores, a exemplo, a implementação de monocultivo em grandes áreas. A microbiota da rizosfera é diversificada e desempenha diferentes funções, atuando como um elo entre as plantas e o solo, auxiliando na manutenção do ecossistema e no desenvolvimento das culturas, embora a rizosfera possa, também, representar um hábitat ideal para alguns fitopatógenos. No contexto agrícola, a prática da compostagem representa a redução de resíduos agrícolas, bem como a redução de custos de produção, uma vez que o composto maduro é utilizado para a adubação do solo, reduzindo a utilização de fertilizantes de origem química. Conhecer a composição microbiana tanto do solo rizosférico da cultura de interesse quanto do composto aplicado ao solo é interessante para um melhor manejo das práticas agrícolas. Neste trabalho foram investigadas a composição e a diversidade de comunidades de bactérias e fungos em solo rizosférico de bananeira em dois estados e em quatro fases de um sistema de compostagem, em que o composto maduro é utilizado para a adubação do solo em ambas as áreas de plantio. Amostras compostas de quatro talhões na Bahia e de quatro talhões no Ceará, bem como das quatro fases do sistema de compostagem, contendo quatro repetições por amostra, foram obtidas e o DNA total extraído e realizado o sequenciamento das regiões V3-V4 do rDNA 16S e ITS1 pela plataforma *Illumina MiSeq*. O *core* microbiano observado para as amostras de solo rizosférico foi formado pelos filos bacterianos Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria e pelos fúngicos Ascomycota, Basidiomycota e Mortierellomycota, sendo os filos Actinobacteria, Firmicutes, Basidiomycota e Mortierellomycota mais abundantes na área da Bahia. Em relação às fases da compostagem, os filos dominantes foram Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria, sendo observada uma redução do filo Firmicutes e aumento dos Actinobacteria e Proteobacteria na fase IV da compostagem, composto maduro. O filo Ascomycota foi o dominante em todas as fases da compostagem, com maior abundância relativa na fase IV (96,8%). Os gêneros *Bacillus* e o *Penicillium* foram mais abundantes na fase IV da compostagem em relação às duas amostras de solo rizosférico, quando analisados os principais gêneros já descritos relacionados à

bananeira. O solo rizosférico do Ceará apresentou menor abundância de microrganismos relatados como benéficos à cultura e, por outro lado, uma maior abundância do gênero *Fusarium*, gênero ao qual pertence o fungo causador da doença mal-do-Panamá, gênero este que não foi observado na fase IV da compostagem. Um maior número de OTUs compartilhadas foi observado para as comunidades bacterianas entre as amostras de solo, embora entre as amostras de solo e a fase IV da compostagem, foi observado um maior compartilhamento de OTUs fúngicas. A distinção da estrutura, abundância e diversidade microbiana analisada variou entre as amostras de solo e compostagem, sendo observado pelas análises de agrupamento, bem como pelas medidas de diversidade aplicadas. Uma maior diversidade microbiana (para bactérias e fungos) foi observada para a área do Ceará e, nas amostras da compostagem, a fase IV apresentou maior diversidade bacteriana, enquanto a fase III uma maior diversidade fúngica. Assim, este trabalho mostra que há a presença de um *core* microbiano em nível de filo nas amostras de cada sistema (solo rizosférico e compostagem), embora existam diferenças na composição e diversidade de comunidades microbianas em níveis taxonômicos mais profundos. A presença de microrganismos relatados na literatura como benéficos à bananicultura e a ausência do *Fusarium* no composto maduro, ressalta que este é um importante veículo de microrganismos potencialmente benéficos para a prática da bananicultura.

1. Introdução

A banana é a segunda fruta mais produzida e consumidas no Brasil (IBGE, 2018), classificando o país como o terceiro maior produtor mundial desta fruta (FAOSTAT, 2018). Em território nacional, a bananicultura detém grande importância socioeconômica, gerando emprego e renda para inúmeras famílias (Godoy et al., 2012; IBGE, 2018). O Nordeste Brasileiro é a segunda região de maior produção de banana no país, estando atrás apenas da região Sudeste, produzindo no ano de 2017 mais de 7 milhões de toneladas e, os Estados da Bahia e do Ceará no mesmo ano, foram o segundo (1.070.000 t) e o quinto (393.0225 t) maiores produtores, respectivamente (IBGE, 2018).

No Nordeste Brasileiro, a Empresa Sítio Barreiras Ltda é uma das maiores produtoras de banana, com polos de produção em três Estados: Bahia, Ceará e Maranhão. A empresa foi criada em 1996 com a implantação do primeiro polo de produção em Missão Velha no estado do Ceará, criando em 2006 um novo polo de produção em Ponto Novo no Estado da Bahia e, em 2013, em Cajuapara, no Estado do Maranhão. As plantas de bananeira micropropagadas são obtidas de empresa e desenvolvidas em estufas, livres de pragas e doenças até serem plantadas no campo. As áreas de plantio compreendem cerca de 280 a 350 ha, subdivididos em talões variando de 2,60 a 5,47 ha, cultivados com as variedades Prata anã e Grand Naine. Nas áreas há a aplicação do fungo *Tichoderma* sp., visando o controle do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), causador da doença mal-do-Panamá, bem com a aplicação de composto orgânico por fertiirrigação. O composto orgânico utilizado para fertilização do solo é produzido pela própria empresa, na unidade de compostagem na unidade de Ponto Novo - Bahia em um sistema *in vessel*. O mesmo é composto de diferentes proporções de resíduos, como cama de aviário, engaço de banana, levedo de cerveja e cana de açúcar. Após passar pelas 4 fases do processo de compostagem, 45 dias de maturação (estágio IV), este é utilizado na adubação de áreas de plantio de banana nos estados da Bahia e Ceará a cada quinze dias.

Embora exista alta produção de banana no Brasil, há pouco conhecimento disponível a respeito da produção orgânica desta fruta, mas é sabido que em todos os polos de produção, existem áreas sob este manejo (Borges et al., 2016). A produção orgânica tem como princípio o cuidado com o meio ambiente, uso equilibrado dos recursos naturais (solo, água, plantas, etc) de modo a prevalecer o equilíbrio entre estes fatores, bem como entre eles e o ser

humano, o que corrobora com a redução do uso de agroquímicos e com o uso sustentável do meio ambiente, preocupações mundiais na área agrícola (Sugiyama & Vivanco, 2010; Borges et al., 2016).

A bananicultura acontece majoritariamente em sistema de monocultura (Alves et al., 2016) e esta prática reflete diretamente na fertilidade, na estrutura e na diversidade microbiana do solo (Bellamy, 2013; Philippot et al., 2013; Ploetz et al., 2015; Chavarria et al., 2018). Os microrganismos, bactérias e fungos especificamente, desempenham papel essencial nos processos biogeoquímicos que ocorrem no solo, no desenvolvimento e proteção de espécies vegetais - pelo aumento da disponibilidade de nutrientes prontamente disponíveis para as plantas na região rizosférica, pela produção de metabólitos que podem atuar na promoção do crescimento vegetal e também no controle de fitopatógenos (Alexander, 2005; Lee e Schmidt, 2014; Anzuay et al., 2015; Hamedí et al., 2015).

As comunidades microbianas respondem às alterações do ambiente, como variação de pH, temperatura, tipo de solo, disponibilidade de nutrientes, cobertura vegetal e isso determina o *core* microbiano de um determinado sistema e pode ser utilizado para um melhor entendimento das interações, do equilíbrio funcional no sistema solo/microrganismos/planta e, conseqüentemente, aplicação em um manejo mais eficiente da biologia do solo e de plantios comerciais (Moyano et al., 2013; Philippot et al., 2013; Larkin et al., 2015; Li et al., 2015).

Ploetz et al. (2015) listaram as doenças e pragas de maior impacto sobre a cultura da bananeira e, dentre elas, as doenças fúngicas são as mais impactantes, tendo como fator relevante, a dispersão dos propágulos por longas distâncias principalmente por intermédio dos ventos, água da chuva e de irrigação (Ma et al., 2013; Ploetz et al., 2015a). O uso intensivo do solo e as práticas de manejo visando a produção vegetal, tais como aplicação de fertilizantes orgânico ou químico, aplicação de microrganismos visando o controle de patógenos do solo e sistema de irrigação interferem na presença e na estabilidade de fitopatógenos do solo, como o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e o nematoide *Radopholus similis*, de grande importância para a cultura da bananeira, podendo causar grandes perdas na produção (Schnitzer et al., 2011; Xue et al., 2015; Chavarria et al., 2018).

O monitoramento dos processos que ocorrem no solo, bem como o entendimento da estrutura e dinâmica das comunidades microbianas na região rizosférica, foram

contemplados pelos avanços tecnológicos, sendo um dos principais o desenvolvimento do sequenciamento de alto rendimento (Logares et al., 2014). Isto possibilitou a investigação independente de cultivo, permitindo acesso à informações que ainda não eram acessadas pelas limitações das técnicas microbiológicas convencionais e, conseqüentemente, maior representatividade da diversidade de comunidades bacterianas e fúngicas do solo (Mande et al., 2012; Finley et al., 2015).

Conhecer a estrutura e diversidade microbiana de sistemas de produção é de grande importância para o manejo adequado do solo, para manter o equilíbrio e a supressividade do solo frente aos microrganismos que podem afetar negativamente a cultura vegetal de interesse, diminuindo os impactos ambientais pela diminuição do uso de agroquímicos (Xue et al., 2015). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a composição e diversidade de bactérias e fungos de solo sob cultivo de bananeira comercial com diferentes anos de monocultivo em dois Estados do Nordeste Brasileiros, bem como de um sistema de compostagem utilizado para a adubação do solo.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção das amostras

As amostras de solo sob cultivo de bananeira foram provenientes de dois polos de produção de banana pertencentes à Empresa Sítio Barreiros Ltda, Missão Velha no estado do Ceará (latitude: 07° 14' 59" S, longitude: 39° 08' 35" W), e Ponto Novo (latitude: 10° 51' 46" S, longitude: 40° 08' 01" W) no estado da Bahia, dois estados do Nordeste Brasileiro. As amostras da compostagem foram obtidas do sistema *in vessel* da composteira da empresa no polo de produção em Ponto Novo - Ba.

As coletas foram realizadas em abril de 2015 nas duas unidades acima citadas da empresa Sítio Barreiros. Amostras de solo sob cultivo de bananeira de quatro talhões na área de plantio no estado da Bahia (BA) e quatro na área de plantio no Estado do Ceará (CE), foram obtidas, com quatro amostras por talhão, totalizando 32 amostras de solo. As coletas de solo foram realizadas com auxílio de tubos de PVC de 5 cm de diâmetro a uma profundidade de 20 cm na região rizosférica de plantas de bananeira escolhidas aleatoriamente. Em relação as amostras da compostagem, quatro pontos em cada uma das diferentes fases de maturação composto (0, 25, 50 e 100% de maturação) foram realizadas

ao longo da leira de compostagem, totalizando 16 amostras.

Após a coleta, os tubos com as amostras foram envolvidos em filme PVC, acondicionados em isopor com gelo e encaminhados ao laboratório, onde foram estocadas em câmara fria à 4 °C até a análise. Análises físico-químicas das amostras foram realizadas pelo laboratório da empresa Sítio Barreiras e fornecidas para utilização neste trabalho (Apêndice A).

2.2. Extração de DNA e sequenciamento *MiSeq*

O DNA total das amostras de solo e compostagem foi extraído a partir da maceração de dez gramas de cada amostra separadamente em nitrogênio líquido e 250 mg foram utilizados para a extração do DNA total utilizando o kit comercial *Nucleo Spin Soil* (Machereye-Nagel, GmbH & Co. KG, Germany), seguindo às recomendações do fabricante. A integridade e a quantificação do DNA extraído foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (0,8%).

Alíquotas do DNA total foram enviadas para o sequenciamento da região V3-V4 do rRNA 16S (para bactérias) e da região ITS1 (para fungos), pelo método 2 x 250 *paired-end* utilizando a plataforma *Illumina MiSeq* pelo *Argonne National Laboratory* (USA).

2.3. Análises de bioinformática

Um total de 3.187.239 e 1.452.923 sequências brutas foram obtidas a partir do sequenciamento das regiões V3-V4 do rRNA 16S e ITS1, respectivamente. Todas as sequências foram tratadas e analisadas utilizando como base a *pipeline* do BMP (Brazilian Microbiome Project), tanto para as sequências da região V3-V4 do gene rRNA 16S (BMP, 2018; Pylro et al., 2014) quanto para a região intergênica ITS1 (BMP, 2018(a); Committee et al., 2014).

Para análise das sequências correspondentes à região V3-V4 do rRNA 16S, as fitas *forward* e *reverse* foram alinhadas para obtenção da fita consenso. Filtros de qualidade foram aplicados às sequências utilizando UPARSE v. 7.1 (Edgar, 2013; UPARSE, 2017): -fastq_filter, remoção de sequências com taxa de erro maior que 0.5 (-fastq_maxee 0.5) e com tamanho menor que 240 nucleotídeos (-fastq_trunclen 240); após a remoção de *singletons* (sequências que só aparecem uma única vez), as sequências foram agrupadas em OTUs

(*Operational Taxonomic Units*) baseado em 97% de identidade, utilizando o algoritmo OTU-UPARSE (-cluster_otus) e as sequências quiméricas foram verificadas com base no banco de dados do UCHIME e removidas usando algoritmo -uchime_ref. A atribuição taxonômica foi realizada utilizando o banco de dados SILVA (Quast et al., 2013; SILVA, 2017) utilizando o método uclust no QIIME v.1.8.0.

Diferentes índices ecológicos foram calculados utilizando o QIIME (algoritmo core_diversity_analyses.py) para descrever a diversidade e riqueza microbianas (índices de Chao1, de Shannon, espécies observadas, cobertura) a partir da normalização das amostras, padronizadas para o mesmo número de sequências, utilizando o comando single_rarefaction.py do Qiime.

Para a análise das sequências ITS, apenas as sequências *forward* foram utilizadas. Assim como para bactérias, filtros de qualidade foram aplicados às sequências utilizando UPARSE v. 7.1 (Edgar, 2013; UPARSE, 2017): -fastq_filter, remoção de sequências com taxa de erro maior que 0.5 (-fastq_maxee 0.5) e com tamanho menor que 140 nucleotídeos (-fastq_trunclen 140). Regiões flangeadoras (18S e 5.8S) e sequências não fúngicas foram removidas por ITSx *software* (Bengtsson-Palme et al., 2013), a fim de manter apenas a região ITS1 hipervariável. *Singletons* foram removidos e as sequências foram agrupadas em OTUs com 97% de identidade, utilizando o algoritmo OTU-UPARSE (-cluster_otus). Sequências quiméricas foram verificadas e removidas usando o algoritmo -uchime_ref e a atribuição taxonômica foi realizada utilizando o banco de dados UNITE (*Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification*, v. 7.2) (UNITE, 2017) utilizando o método Blast no QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). As análises de diversidade foram realizadas com dados normalizados (single_rarefaction.py) e calculados utilizando o QIIME (core_diversity_analyses.py).

2.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando os pacotes “phyloseq”, “vegan” e “VennDiagram” no programa R *software* (versão 3.4.1 <https://www.rstudio.com/>). As análises multivariadas CAP (*Constrained Analysis of Principal Coordinate or Distance-based in RDA*), em função da composição e abundância taxonômica das OTUs e dos dados ambientais das amostras e a PCoA (*Principal Coordinates Analysis*) para análise do

agrupamento das amostras foram realizadas com base nas matrizes de distância UniFrac e Bray Curtis. Diagramas de *Venn* foram construídos para mostrar as OTUs únicas e compartilhadas entre as diferentes amostras. Análises de similaridade (ANOSIM) para avaliar diferença estatística entre as amostras foram realizadas no QIIME v.1.8.0 (compare_categories.py) utilizando as matrizes de distância UniFrac para bactérias e Bray-Curtis para fungos.

3. Resultados

3.1. Composição taxonômica das amostras

Vinte e seis filos bacterianos foram observados nas amostras de solo e cinco nas amostras de compostagem. Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria foram dominantes em todas as amostras e Acidobacteria apenas para as amostras de solo (Apêndice B), compreendendo 76.9% e 99.5% das OTUs das amostras de solo e de compostagem, respectivamente.

Um total de seis filos fúngicos tanto para as amostras de solo quanto para as amostras de compostagem foram observados (Apêndice B). Os filos Ascomycota e Basidiomycota foram os mais abundantes em todas as amostras, representando 77.1% e 90.4%, para o solo e compostagem, respectivamente. O filo Mortierellomycota apareceu apenas nas amostras de solo (aparecendo apenas na fase III - 0.7% - da compostagem), enquanto Mucoromycota foi observado apenas nas amostras da compostagem.

Embora exista a dominância de filos em comum nas amostras de solo, é possível identificar diferenças na abundância relativa dentre os diferentes filos (Apêndice B), como também das classes mais abundantes (Fig. 1). Entre as fases da compostagem, as classes dominantes foram Actinobacteria, Bacilli e Clostridia nas duas primeiras fases e Gammaproteobacteria e as fúngicas Saccharomycetes e Mucoromycetes dominantes na fase I, Agaricomycetes nas fases II e III e a Sordariomycetes nas III e IV. Em níveis taxonômicos mais profundos, como em nível de gênero, os resultados mostraram diferença na presença e abundância relativa para bactérias e fungos (Apêndice D), como para aqueles descritos na literatura relacionados diretamente à bananeira (Apêndice C), em ambas as amostras de solo e na fase IV da compostagem, a qual é utilizada para aplicação no solo, por isso foi dada maior importância dentre as fases.

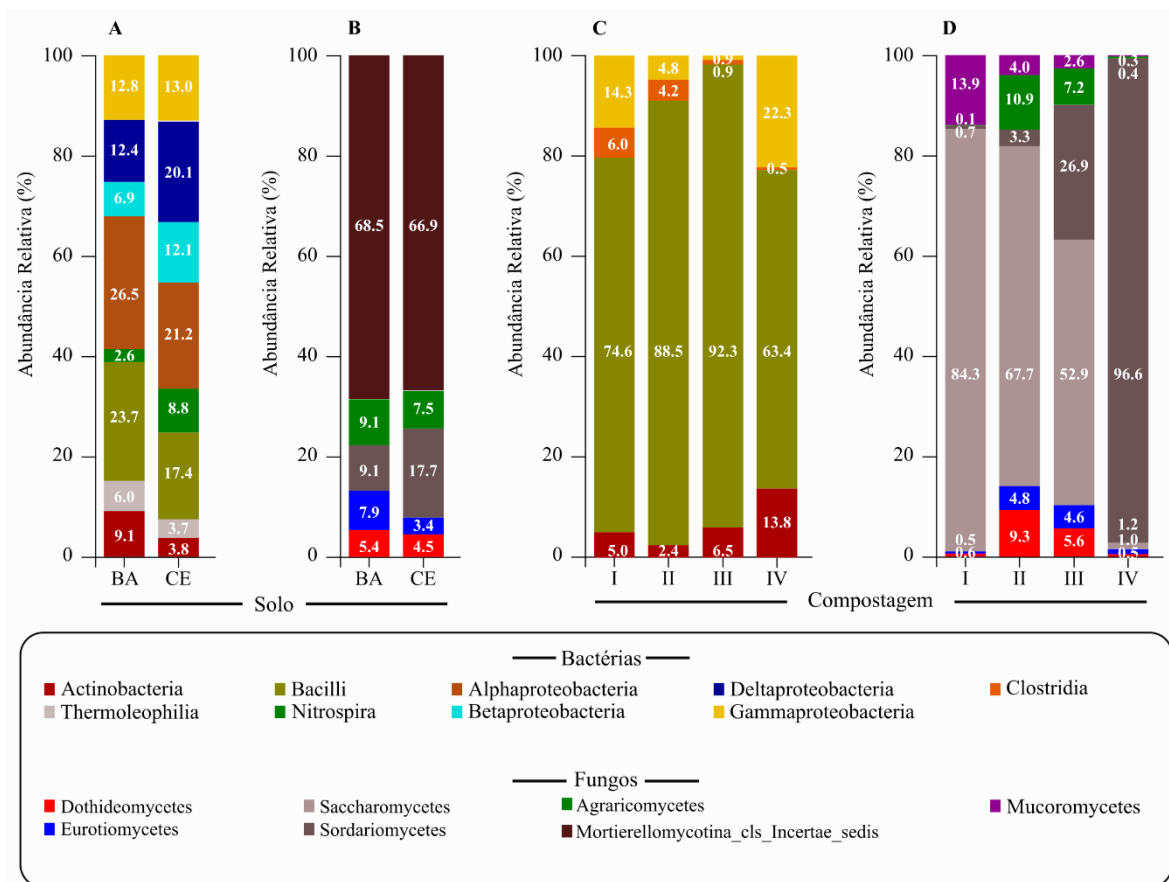


Figura 1. Abundância relativa das classes mais abundantes de bactérias (A e C) e fungos (B e D) nas amostras de solo rizosférico de bananeira de dois Estados Brasileiros (BA: Bahia; CE: Ceará) e em quatro fases de um sistema de compostagem (I, II, III, IV).

As amostras de solo rizosférico apresentaram 1500 e 280 OTUs correspondentes à gêneros bacterianos e fúngicos, respectivamente; as amostras da compostagem apresentaram 567 OTUs correspondentes à gêneros bacterianos e 123 OTUs correspondentes à gêneros fúngicos, embora muitos destes sem correspondência nos bancos de dados, dessa forma, não identificados. Os gêneros identificados e mais abundantes em cada amostra estão descritos na tabela 4 do material suplementar. O gênero *Bacillus* foi o mais abundante em todas as amostras, tanto de solo como do composto orgânico, quanto aos demais gêneros houve uma variação dentre as amostras. Nos solos rizosféricos, dentre os mais abundantes estão *Pseudomonas*, *Variibacter*, *Mortierella*, *Ganoderma* e *Aspergillus*; nas amostras da compostagem, fase I: *Sporosarcina*, *Psychrobacter*, *Candida* e *Rhizomucor*, fase II: *Sinibacillus*, *Preussia*, *Candida* e *Pisolithus*, fase III: *Oceanobacillus*, *Candida* e *Debaryomyces* e fase IV: *Oceanobacillus*, *Halomonas*, *Aspergillus* e *Candida*.

A amostra do solo rizosférico da Bahia apresentou um maior número de *táxons*

(OTUs) únicos em relação à amostra do Ceará e a fase IV da compostagem, tanto para bactérias quanto para fungos (Fig. 2). O maior número de OTUs compartilhadas está entre as amostras de solo, tanto para as bacterianas quanto para as fúngicas e, das OTUs presentes na fase IV da compostagem, apenas 0,316% das OTUs bacterianas e 2,27% das OTUs fúngicas são exclusivas dessa amostra. Entre as amostras de solo rizosférico e da fase IV, há um maior compartilhamento de OTUs entre as amostras da fase IV e a do solo da Bahia, para ambas as comunidades microbianas e, menos de 4% de todas as OTUs são compartilhadas entre as três amostras.

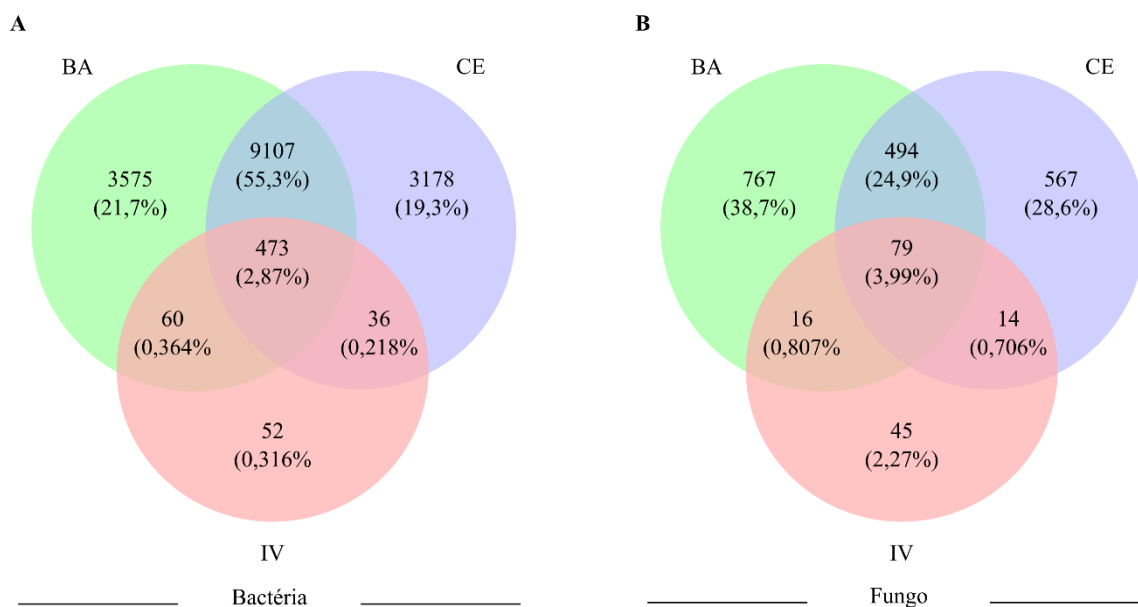


Figura 2: Diagrama de Venn mostrando as OTUs únicas e compartilhadas entre as amostras do solo rizosférico da Bahia (BA), do Ceará (CE) e da fase IV (composto maduro) da compostagem, com as suas respectivas porcentagens.

As OTUs únicas e compartilhadas que apresentaram classificação estão descritos no apêndice E. Os gêneros bacterianos: *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Ammoniphilus*, *Paenibacillus* e fúngicos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mortierella* foram observados em todas as amostras. Para as fases da compostagem, mais de 50% das OTUs são exclusivas de cada fase (total de 50,36% das OTUs bacterianas e 58,3% total das OTUs fúngicas) (Apêndice F), ressaltando ainda mais a diferença na composição microbiana entre as fases ao longo do sistema de compostagem.

3.2. Detecção de gêneros microbianos benéficos à cultura de bananeira

Alguns microrganismos são descritos na literatura com atuação na promoção do

crescimento vegetal, bem como no controle biológico de (micro)organismos que causam doenças na bananeira, como o fungo *Foc* e o nematoide *Rodophilus similis*, ambos presentes no mais variados tipos de solo e, alguns gêneros associados ao controle desses organismos e à promoção do crescimento de bananeira estão descritos no apêndice C. Uma busca por OTUs correspondentes à microrganismos associados ao controle de patógenos (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*) e ao crescimento vegetal (*Streptomyces*, *Serratia*, *Pseudomonas*) de bananeira foi realizada nos dados das amostras de solos da Bahia e do Ceará, e da fase IV da compostagem, fase que representa o composto “maduro”, pronto para a aplicação em tais áreas de plantio de bananeira (Fig. 3).

Microrganismos potenciais para o desenvolvimento vegetal e controle de patógenos do solo, contribuem para tornar um solo supressivo e aumentar a produtividade da cultura agrícola e, dentre os gêneros destacados no apêndice C, foi observada uma semelhança na riqueza para as amostras de solo do Ceará, que apresentou 7 gêneros, enquanto da Bahia 6. Entretanto, em relação a abundância, os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram mais numerosos no solo da Bahia em contraste ao do Ceará, que apresentou maior abundância para os gêneros *Streptomyces* e *Fusarium*. O gênero *Trichoderma* foi observado em baixa abundância na microbiota das áreas do Ceará e não foi detectado nas áreas estudadas da Bahia.

A fase IV da compostagem, semelhante às amostras de solo, apresentou dominância do gênero *Bacillus*. Dentre os demais gêneros analisados, observou-se a presença de *Penicillium* e *Aspergillus* e a ausência do gênero *Fusarium*. Os gêneros *Serratia* e *Paecilomyces* não foram detectados em nenhuma das três amostras em estudo.

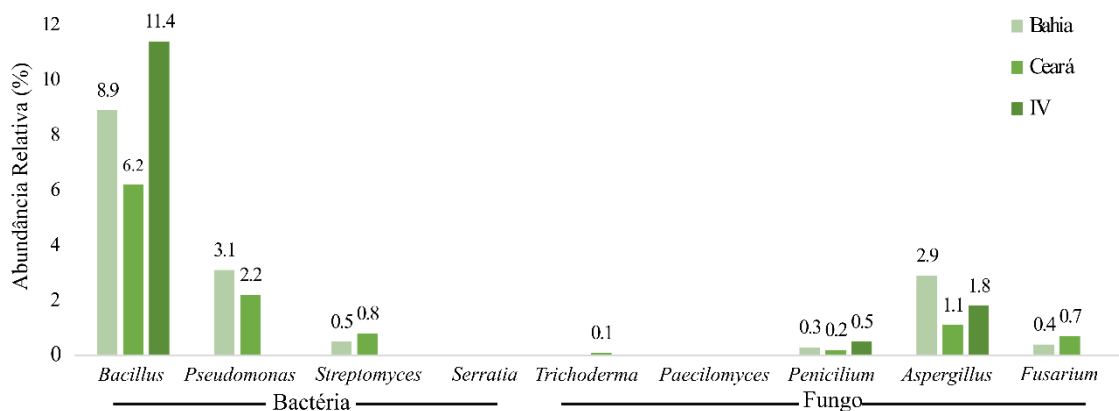


Figura 3: Abundância dos principais gêneros associados ao controle de *Foc* e do *R. similis* e à promoção do crescimento vegetal da bananeira nas amostras de solo rizosférico da Bahia e do Ceará e da fase IV da compostagem.

3.3. Índices de diversidade microbiana

Os índices de diversidade microbiana foram calculados após normalização das amostras (Tabela 1). O número de OTUs bacterianas e fúngicas observadas foi maior nas amostras de solo rizosférico da Bahia em relação as amostras do Ceará. Os índices de riqueza de espécies, Chao1 e ACE, e de diversidade, Shannon e Simpson, apresentaram pouca variação entre as amostras de solo rizosférico da Bahia e do Ceará.

Já no sistema de compostagem, o maior número de OTUs bacterianas foi observado nas fases I e III, enquanto que para fungos, nas fases II, II e IV. Este padrão refletiu nos índices de riqueza de espécies tanto de bactérias como de fungos. Entretanto quando se observa os índices de diversidade de espécies bacterianas, verifica-se que as diferentes fases apresentaram valores semelhantes e que as fases II e III apresentam maiores índices de diversidade para fungos, provavelmente por apresentarem maiores valores de equitabilidade que as fases I e IV.

Tabela 1: Análises de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) com 97% de identidade de sequências, estimadores de riqueza Chao1 e ACE (*Abundance-Based Coverage Estimator*), estimadores de diversidade (Shannon e Simpson), cobertura de sequenciamento, equitabilidade das OTUs dentro das amostras em nível de gênero nas duas amostras de solo rizosférico e nas diferentes fases do sistema de compostagem, baseadas nas regiões V3-V4 do gene 16S rRNA de bactérias e da região ITS do gene 18S rRNA de fungos.

		Solo								
		<i>Amostras</i>	<i>Sequências</i>	<i>OTUs</i>	<i>Cobertura</i>	<i>Equitabilidade</i>	<i>Chao1</i>	<i>ACE</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>
		Bahia	51.925	12.772	0,9789	0,79	4786,47	4853,92	9,41	0,9911
		Ceara	51.925	12.062	0,9786	0,81	4996,34	5060,8	9,61	0,9937
		Compostagem								
Bactérias	<i>Amostras</i>	<i>Sequências</i>	<i>OTUs</i>	<i>Cobertura</i>	<i>Equitabilidade</i>	<i>Chao1</i>	<i>ACE</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>	
	I	37.689	662	0,9959	0,44	600,27	605,01	3,77	0,8087	
	II	37.689	407	0,9969	0,47	455,64	473,51	3,85	0,8650	
	III	37.689	699	0,9961	0,47	601,05	586,37	3,95	0,8546	
	IV	37.689	571	0,9970	0,54	486,99	491,35	4,44	0,8937	
		Solo								
		<i>Amostras</i>	<i>Sequências</i>	<i>OTUs</i>	<i>Cobertura</i>	<i>Equitabilidade</i>	<i>Chao1</i>	<i>ACE</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>
		Bahia	6.217	1.145	0,9913	0,44	237,64	239,82	3,34	0,6523
		Ceará	6.217	881	0,9909	0,47	248,82	245,10	3,52	0,7423
		Compostagem								
Fungos	<i>Amostras</i>	<i>Sequências</i>	<i>OTUs</i>	<i>Cobertura</i>	<i>Equitabilidade</i>	<i>Chao1</i>	<i>ACE</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>	
	I	3.025	87	0,9942	0,30	59,09	68,11	1,65	0,4926	
	II	3.025	136	0,9920	0,53	114,37	104,48	3,36	0,7881	
	III	3.025	127	0,9932	0,53	108,51	106,74	3,45	0,7372	
	IV	3.025	139	0,9911	0,17	123,06	100,72	0,94	0,2212	

3.4. Análise multivariada

A análise multivariada CAP (*Constrained Analysis of Principal Coordinate* or Distance-based in RDA) foi realizada para analisar a influência de componentes físico-químicos do solo sobre as amostras de rizosfera do Ceará e Bahia (Fig. 4). As condições do solo foram responsáveis por explicar a distribuição e agrupamento das comunidades bacterianas em 72.89%. Deste total, 46.8% são explicados pelo eixo 1 na análise de componentes principais, enquanto o eixo 2 apresenta uma explicação de 26.09%. Para as comunidades fúngicas, a distribuição destas esponderam 54.44% aos fatores do solo, sendo 33.66% explicado pelo eixo 1 e 21.22% pelo eixo 2. A análise destaca o agrupamento das amostras por Estado, tanto para as comunidades bacterianas quanto para as fúngicas (Figura 4 A e B), com os componentes ambientais apresentando influência nesta distribuição das comunidades bacteriana e fúngica das amostras do Ceará, sendo o potássio (K) e o fósforo (P) os mais representativos, já para as comunidades fúngicas, a matéria orgânica foi o fator mais representativo para ambas as amostras (Fig. 4B).

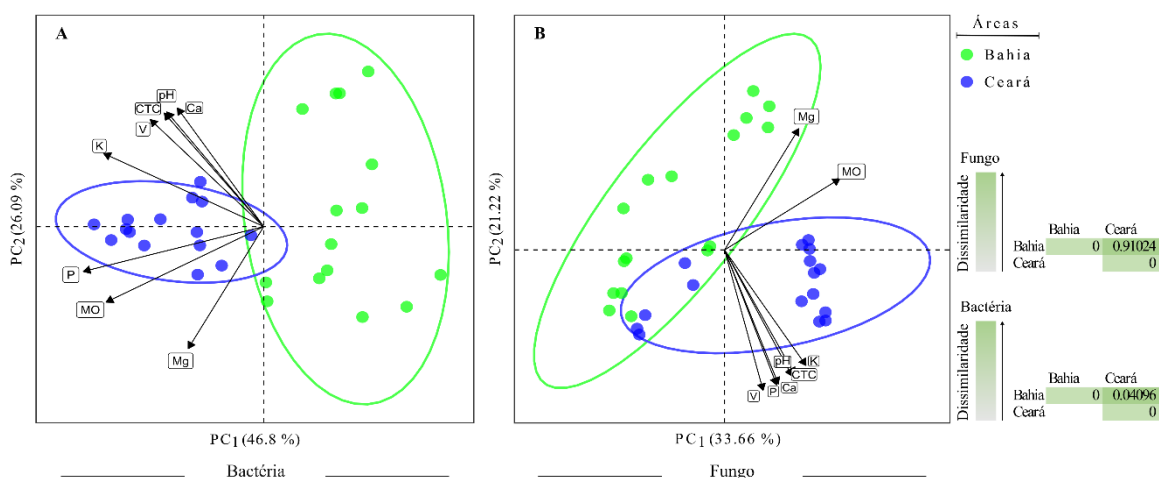


Figura 4: Análises de coordenadas principais geradas utilizando as matrizes de distância UniFrac (para bactérias) e Bray-Curtis (para fungos), utilizando os dados de composição microbiana e dados químicos das amostras de solo das duas áreas - (A) comunidades bacterianas e (B) comunidades fúngicas - e de variáveis ambientais. MO: matéria orgânica; P: fósforo; K: potássio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; CTC: capacidade de troca catiônica; V: índice de saturação de bases; pH.

Cada círculo do gráfico representa uma repetição das amostras dentro de cada área, consistindo em dezesseis pontos nas áreas da Bahia e dezesseis pontos nas áreas do Ceará.

A análise de coordenadas principais (PCoA), com base nas matrizes de distância UniFrac para bactérias e Bray-Curtis para fungos, das comunidades microbianas revelou significativa diferença entre as comunidades microbianas das amostras de solo rizosférico e

do composto orgânico (Fig. 5), confirmada pela análise ANOSIM (bactérias: $r = 0.784$; $p = 0.001$. Fungos: $r = 0.664$; $p = 0.001$). Uma maior dissimilaridade da comunidade bacteriana foi observada entre a fase IV e o solo rizosférico do Ceará, em contrapartida, a composição fúngica da fase IV apresenta maior dissimilaridade em relação ao solo rizosférico da Bahia.

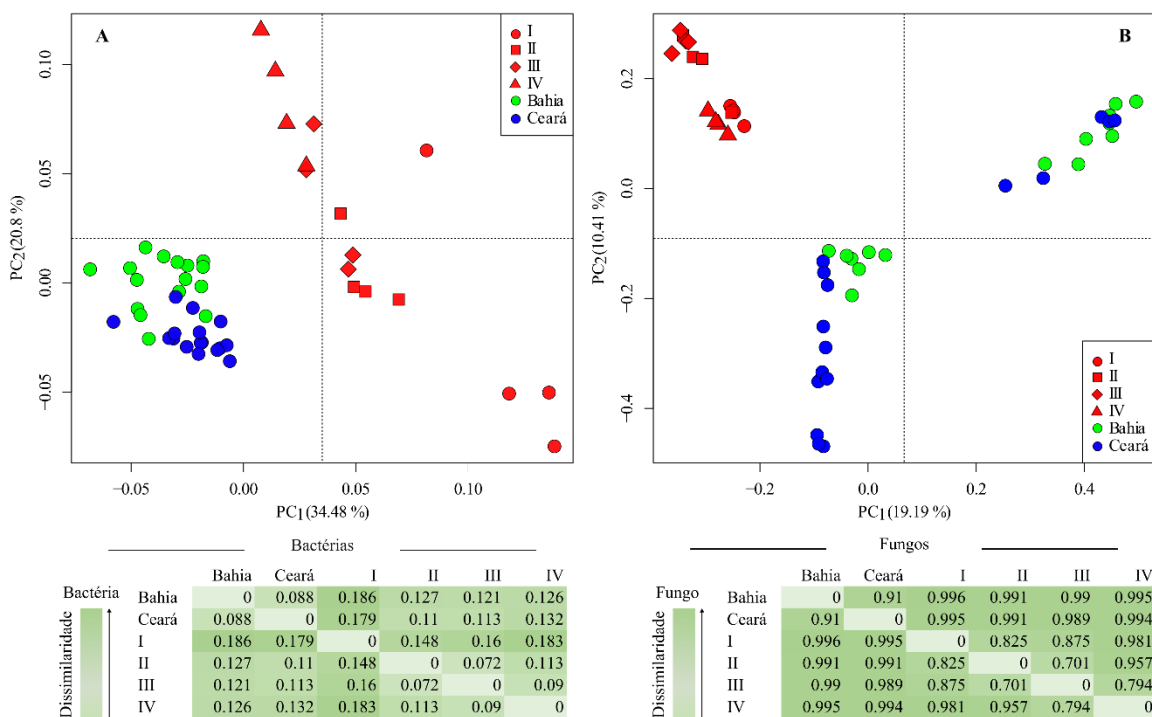


Figura 5. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada nas matrizes de distância UniFrac e Bray Curtis para o agrupamento das comunidades bacterianas (A) e fúngicas (B) das amostras de solo da Bahia e do Ceará e das fases da compostagem, de acordo com a composição e abundância.

É possível observar a distribuição dos pontos amostrais do solo rizosférico agrupados por Estado, principalmente para as comunidades bacterianas. E, para a compostagem, um agrupamento definido pelas fases, sendo a fase I e a IV as mais dissimilares, tanto para as comunidades bacterianas quanto para as fúngicas.

4. Discussão

A análise da estrutura e diversidade microbiana pela abordagem independente de cultivo gerou conhecimento e entendimento da composição e diversidade microbiana de solo sob cultivo de bananeira de plantio comercial em áreas situadas em dois diferentes Estados do Nordeste Brasileiro, bem como das fases de um sistema de compostagem, da qual o composto orgânico maduro é utilizado para a fertilização do solo. Tais análises permitiram

uma investigação com maior abrangência e representatividade da diversidade de espécies presentes nestas comunidades microbianas, o que poderá contribuir para um melhor manejo do solo e controle de doenças de plantas veiculadas pelo solo (Mande et al., 2012; Finley et al., 2015, Xue et al., 2015).

As diferenças na riqueza e diversidade de espécies microbianas entre as amostras de solo rizosférico e composto orgânico, observada ao longo das diferentes análises realizadas, são reflexos das particularidades de cada ambiente. A região rizosférica funciona como um habitat rico em nutrientes, pois as raízes das plantas liberam exsudatos de diferentes composições e pesos moleculares (aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, açúcares, vitaminas, dentre outros recursos), dependendo da espécie vegetal, idade da planta e/ou das condições ambientais, os quais servem como fonte de carbono disponível para os microrganismos (Philippot et al., 2013; Reinhold-Hurek et al., 2015; Steinauer et al., 2016). Assim, a abundância de grupos específicos de microrganismos na região rizosférica, principalmente em nível de gênero, é superior quando comparada ao longo da massa do solo e também a um sistema de compostagem, dada a riqueza de determinadas fontes de nutrientes prontamente disponíveis na rizosfera (Palaniyandi al., 2013; Pii et al., 2015; Reinhold-Hurek et al., 2015; Tan et al., 2017). Em contrapartida, o sistema de compostagem apresenta em suas diferentes fases alterações marcantes de fatores determinantes para o estabelecimento de comunidades microbianas, como a concentração de oxigênio, temperatura, composição do material inicial, pH, umidade, tamanho das partículas, dentre outros, o que seleciona específicos grupos microbianos (Yu et al., 2007; López-González et al., 2015; Ren et al., 2016).

A diferença nos índices de diversidade microbiana entre as amostras de solos rizosféricos da Bahia e Ceará (Tabela 1), representado pelo índice de Shannon, em função da equitabilidade e riqueza de espécies, é observado também pelo número de OTUs compartilhadas entre estas amostras. Os filos bacterianos Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e os filos fúngicos Ascomycota, Basidiomycota e Mortierellomycota (Fig. 2A e B), são os dominantes nas diferentes amostras. Filos estes que são encontrados em diferentes tipos de ambientes (Wang et al., 2016; Zhang et al., 2016; Xu et al., 2017; Shen et al., 2019), uma vez que compreendem grupos relacionados à diversas funções ambientais, sendo uma de grande importância, a promoção do crescimento vegetal,

com os filos Proteobacteria, Firmicutes e Acinobactéria, os quais compreendem um maior número de espécies já identificadas como promotoras do crescimento vegetal, capazes de colonizar ambientes com características variadas (Yadav et al., 2017). A dominância de grupos microbianos, tanto de bactérias quanto de fungos, pode ser explicada pelo fato que em ambos os Estados prevalece a prática do monocultivo de bananeira por mais de 10 anos, o que limita a estrutura microbiana (Philippot et al., 2013), uma vez que há apenas um genótipo vegetal predominante (bananeira) e, conseqüentemente, os exsudados radiculares liberados nas rizosferas são pouco diversificados (Qin et al., 2016; Andreote et al., 2017).

Além dos fatos descritos acima, as práticas culturais aplicadas em ambas as áreas de cultivo são as mesmas, o que também pode ter contribuído para a dominância de alguns grupos de microrganismos entre as áreas. Tais práticas culturais consistem na aplicação quinzenal de *Trichoderma*, gênero já descrito como eficaz no controle biológico de fitopatógenos do solo, como o fungo causador do mal-do-Panamá, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, que é um dos problemas enfrentados nos bananais da empresa, e calagem, que auxilia na correção da acidez do solo e na diminuição da proliferação de fungos fitopatogênicos no solo (Bissett et al., 2011; Wang et al., 2015; Goss-Souza et al., 2017).

Mesmo sendo aplicado nas áreas de estudo, o gênero *Trichoderma* apresentou uma baixa prevalência nas amostras. Tal resultado pode estar associado a viabilidade do inóculo e a taxa de sobrevivência deste no solo, frente a competitividade com a microbiota endêmica das áreas. Mostrando, com isso, a importância de conhecer a estrutura, diversidade e abundância das comunidades microbianas da região rizosférica estudada, bem como as condições adaptativas de inóculos microbianos antes da aplicação deste no solo e principalmente após aplicação para saber se o mesmo permanece presente (Xue et al., 2015; Li et al., 2018).

Entretanto, foi verificada a presença nas amostras estudadas de gêneros microbianos já descritos na literatura como eficientes para o controle de fitopatôgenos importantes, como o fungo *Foc* e o nematoide *Radopholus similis*, para o cultivo de bananeiras (Fig. 2). Tais gêneros benéficos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Penicilium*, *Aspergillus* atuam tanto pela ação antagônica, como também pela promoção de crescimento da planta (Lim & Kim, 2009; Islam et al., 2014), sendo o gênero *Bacillus* o mais abundante em todas as amostras, corroborando com Xue et al. (2015) já sendo descrito como o mais abundante

em solo rizosférico de bananeira e presente em todas as fases da compostagem, como descrito por Zhou et al. (2016). Estes, além dos gêneros *Azoarcus*, *Brevibacterium*, *Nocardioides*, *Paenibacillus*, são de fundamental importância para a manutenção da saúde do solo (Xue et al., 2015; Yadav et al., 2017) e também para o bom desenvolvimento da planta, atuando na produção de hormônios do crescimento vegetal, fixação de nitrogênio, solubilização de minerais, produção de sideróforos ou mesmo de substância que atuam diretamente contra fitopatógenos (Barea et al., 2005; Palaniyandi et al., 2013; Wu et al., 2015; Yadav et al., 2017).

Adicionalmente, o gênero *Mortierella* dominante em ambas as amostras de solo rizosférico é também considerado de grande importância para culturas agrícolas por estar relacionado a promoção de crescimento da planta (Borrell et al., 2017). O gênero *Mortierella* auxilia tanto culturas agrícolas, como fungo micorrízico na captação de fósforo no solo, como também considerado eficiente decompositor de matéria orgânica (Li et al., 2018a; Osorio & Habte, 2010). Li et al. (2018b) constataram que a fertilização orgânica aumenta significativamente a abundância deste gênero, tanto na região rizosférica quanto em todo o corpo do solo. Este gênero pertence ao filo Mortierellomycota, o mais abundante detectado nas amostras de solo rizosférico, o qual era classificado como Zygomycota, caracterizado por compreender fungos em sua maioria saprofíticos, decompositores de matéria orgânica, embora alguns fungos deste grupo podem se comportar como patógenos oportunistas (Lin et al., 2014; Spatafora et al., 2016; Tedersoo et al., 2018).

Apesar da variação na abundância, filos dominantes também foram observados entre as fases da compostagem: os bacterianos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria, e os filos fúngicos Ascomycota, Basidiomycota e Mucoromycota (Fig. 1C e D). Entretanto, em níveis taxonômicos mais profundos, como gênero, foi possível observar uma sucessão microbiana entre as fases da compostagem, o que é observado também pelo número de OTUs compartilhadas, em que apenas 17,6% das OTUs bacterianas e 12,1% das OTUs fúngicas foram compartilhadas, apresentando mais de 50% das OTUs tanto bacterianas quanto fúngicas, únicas entre as diferentes fases. O gênero identificado presente em todas as fases, foi o gênero *Candida*, com uma dominância de 82,6% na fase I, como reflexo direto da utilização do levedo de cerveja como um dos resíduos da compostagem, gênero este dominante neste tipo de resíduo (Mussatto et al., 2005) e chegando até a fase IV, no composto

maduro, com apenas 0,8%. A variação da abundância deste gênero é em decorrência das alterações de temperatura, pH ao longo das fases de compostagem (Zhou et al., 2016).

O composto orgânico, além de atuar como uma prática ecologicamente correta, reduzindo o acúmulo de resíduos agropecuários (Pérez-Piqueres et al., 2006; Ren et al., 2016), no solo, atua levando diferentes nutrientes, na eliminação de microrganismos patogênicos e/ou seus propágulos ao longo das fases, reduzindo a necessidade de aplicação de fungicidas (Zhou et al., 2016), os quais causam sérios problemas na saúde humana e do solo, além de veicular microrganismos benéficos que ajudam a tornar o solo supressivo auxiliando no controle de fitopatógenos (Pérez-Piqueres et al., 2006; Zhou et al., 2016). A ausência do gênero *Fusarium* na fase IV da compostagem (Fig. 3) foi um bom indicativo que há a eliminação do *Foc* ao longo do processo de compostagem e que o composto orgânico maduro é aplicado no solo livre deste patógeno (Yu et al., 2007). A ausência de *Fusarium* no composto maduro, bem como a presença de gêneros importantes para o controle biológico do mesmo, pode ter contribuído para a baixa incidência de *FOC* nas áreas avaliadas, bem como para um futuro isolamento de microrganismos que possam ser utilizados como biocontroladores de fitopatógenos.

Como mostrado na Tabela S1, os componentes avaliados do solo (matéria orgânica, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, capacidade de troca catiônica e índice de saturação de bases) não apresentaram alta variação entre as duas áreas, isso devido a ambas as áreas estarem sob manejo agrícola há longo tempo e a preocupação com a nutrição do solo ser indispensavelmente considerada visando uma maior produtividade (Piromyou et al., 2011; Larkin et al., 2015). Embora as condições edafoclimáticas de cada local e fase de compostagem influenciem significativamente na estrutura e diversidade de comunidades microbianas (Zhang et al., 2013; Xu et al., 2017), a disponibilidade de material orgânica e outros nutrientes no solo, pH e tipo de solo, influenciam não só a estrutura e diversidade, como também à resposta fisiológica desses microrganismos no solo (Sradnick et al., 2013; Xu et al., 2017; Jansson & Gang, 2018).

5. Conclusões

Em ambas as áreas de plantio de bananeira, nos dois Estados, os filos dominantes foram Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Ascomycota,

Basidiomycota e Mortierellomycota. Houve pouca variação nos índices de diversidade entre as amostras de solo, embora diferenças na composição e abundância relativa de famílias e gêneros, gêneros como *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Penicilium* e *Aspergillus* foram detectados nas três amostras analisadas. A presença de tais gêneros indica que nessas áreas há microrganismos com potencial biotecnológico, que podem ser isolados, investigados e, posteriormente, serem utilizados em inoculantes. A ausência do gênero *Trichoderma* nas amostras de solo rizosférico da Bahia e a baixa incidência nas amostras do Ceará representa a ineficiência do processo de inoculação do *Trichoderma* nestas áreas ou mesmo a inviabilidade do inóculo ou sua incapacidade de estabelecimento nestes solos. É necessária uma melhor investigação do que pode estar causando a baixa incidência desse gênero nestas áreas.

O composto orgânico é um importante veículo de microrganismos potencialmente benéficos para a prática da bananicultura, sendo verificada a presença dos gêneros *Bacillus*, *Penicilium* e *Aspergillus*, importantes para o controle de patógenos de bananeira e promoção de crescimento da planta e, por outro lado, não veicula um patógeno de grande impacto para a produção de banana, o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, não sendo observada a presença do gênero *Fusarium* no composto maduro.

6. Referência

- Alexander, D., B., 2005. Bacteria and Archaea. In.: Silvia, D., M., et al. Principles and applications of soil microbiology. 2nd ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 101-139.
- Alves, E., J., Lima, M., B., Donato, S., L., R., Rodrigues, M., G., V., 2016. Planejamento e estabelecimento de um plantio comercial. In.: Lima, M., B., Silva, S., O., Ferreira, C., F., (Edit.). 2ª ed. Embrapa. Brasília – DF, p. 399-440.
- Andreote, F., Silva, M., 2017. Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture. *Curr Opin Microbiol* 37, 29–34.
- Anzuay, M., Frola, O., Angelini, J., Ludueña, L., Ibañez, F., Fabra, A., Taurian, T., 2015. Effect of pesticides application on peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated phosphate solubilizing soil bacteria. *Appl Soil Ecol* 95, 31–37. BAREA, J. M. et al. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 417, p. 1761–1778, 2005.
- Bellamy, A., 2013. Banana Production Systems: Identification of Alternative Systems for More Sustainable Production. *Ambio* 42, 334–343.
- Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., Wit, P., Sánchez-García, M., Ebersberger, I., Sousa, F., Amend, A., Jumpponen, A., Unterseher, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Bertrand, Y., Sanli, K., Eriksson, K., Vik, U., Veldre, V., Nilsson, R., 2013. Improved

software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol Evol* 4, 914–919.

Bissett, A., Richardson, A., Baker, G., Thrall, P., 2011. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. *Appl Soil Ecol* 51, 66–78.

BMP, 2018. <http://www.brmicrobiome.org/16sillumina> (acessado em fevereiro de 2018).

BMP, 2018a. Disponível em: <http://www.brmicrobiome.org/its-profiling-new-illumina> (acessado em fevereiro de 2018).

BORGES, A., L., Cordeiro, Z., M., Fancelli, M., Ritzinger, C., H., S., P., Souza, L., S., 2016. Cultivo orgânico. In.: Lima, M., B., Silva, S., O., Ferreira, C., F., (Edit.). 2ª ed. Embrapa. Brasília – DF, p. 772-810, 2016.

Borrell, A., Shi, Y., Gan, Y., Bainard, L., Germida, J., Hamel, C., 2017. Fungal diversity associated with pulses and its influence on the subsequent wheat crop in the Canadian prairies. *Plant Soil* 414, 13–31.

Committee, T., Pylro, V., Roesch, L., Ortega, J., Amaral, A., Tótolá, M., Hirsch, P., Rosado, A., Góes-Neto, A., Silva, A., Rosa, C., Morais, D., Andreote, F., Duarte, G., Melo, I., Seldin, L., Lambais, M., Hungria, M., Peixoto, R., Kruger, R., Tsai, S., Azevedo, V., 2014. Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity—Challenges and Prospects. *Microbial Ecol* 67, 237–241.

Chavarria, D., Pérez-Brandan, C., Serri, D., Meriles, J., Restovich, S., Andriulo, A., Jacquelin, L., Vargas-Gil, S., 2018. Response of soil microbial communities to agroecological versus conventional systems of extensive agriculture. *Agric Ecosyst Environ* 264, 1–8.

Climate, 2018. <https://pt.climate-data.org/> (acessado em julho de 2018).

Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M.I., Steinberg, C., Alabouvette, C., 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology Biochem* 34, 467–476.

Edgar, R., 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 10, nmeth.2604.

Faostat, 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (acessado em outubro de 2018).

Finley, S., Benbow, M., Javan G., 2015. Potential applications of soil microbial ecology and next-generation sequencing in criminal investigations. *Applied Soil Ecology* 88, 69-78.

GODOY, R., C., B., Poiani, L., M., Waszczynskj, N., Viana, E., L., Matsuura, F., C., Matsuura, M., I., S., F., 2012. Processamento e produção. In.: Lima, M., B., Silva, S., O., Ferreira, C., F., (Edit.). 2ª ed. Embrapa. Brasília – DF, p. 197-204, 2012.

Goss-Souza, D., Mendes., L., W., Borges, C., D., Baretta, D., Tsai, S., M., Rodrigues, J., M., 2017. Soil microbial community dynamics and assembly under long-term land use change. *FEMS Microbiology Ecology* 93 (10), 1-13.

- Hamed, J., Mohammadipanah, F., 2015. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *J Ind Microbiol Biot* 42, 157–171.
- Ibge, 2018. <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil> (acessado em outubro de 2018).
- Islam, M., Sultana, T., Joe, M., Yim, W., Cho, J., Sa, T., 2013. Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. *J Basic Microb* 53, 1004–1015.
- Jansson, J., Hofmockel, K., 2018. The soil microbiome—from metagenomics to metaphenomics. *Curr Opin Microbiol* 43, 162–168.
- Langarica-Fuentes, A., Zafar, U., Heyworth, A., Brown, T., Fox, G., Robson, G., 2014. Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing. *Fems Microbiol Ecol* 88, 296–308.
- Larkin, R., 2015. Soil Health Paradigms and Implications for Disease Management. *Annual Review of Phytopathology* 53 (1), 1-23.
- Lee, Z., Schmidt, T., 2014. Bacterial growth efficiency varies in soils under different land management practices. *Soil Biology and Biochemistry*. 69, 282-290.
- Li, C., Yan, K., Tang, L., Jia, Z., Li, Y., 2014. Change in deep soil microbial communities due to long-term fertilization. *Soil Biology Biochem* 75, 264–272.
- Li, F., Chen, L., Redmile-Gordon, M., Zhang, J., Zhang, C., Ning, Q., Li, W., 2018(b). *Mortierella elongata*'s roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil. *Land Degradation & Development - Wiley Online Library* 29, 1642–1651.
- Li, Y.-T., Hwang, S.-G., Huang, Y.-M., Huang, C.-H., 2018. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. *Crop Prot* 110.
- Lim, J.-H., Kim, S.-D., 2009. Synergistic plant growth promotion by the indigenous auxins-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. *J Korean Soc Appl Bi* 52, 531–538.
- Logares, R., Sunagawa, S., Salazar, G., Cornejo-Castillo, F., Ferrera, I., Sarmiento, H., Hingamp, P., Ogata, H., Vargas, C., Lima-Mendez, G., Raes, J., Poulain, J., Jaillon, O., Wincker, P., Kandels-Lewis, S., Karsenti, E., Bork, P., Acinas, S., 2014. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environ Microbiol* 16, 2659–2671.
- López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Jurado, M.M., Moreno, J., 2015. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technol* 175, 406–416.
- Ma, J., Ibekwe, A., Yang, C.-H., Crowley, D., 2016. Bacterial diversity and composition in major fresh produce growing soils affected by physiochemical properties and geographic locations. *Sci Total Environ* 563, 199–209.
- Mande, S., S., Mohammed, M., H., Ghosh, T., S., 2012. Classification of metagenomic sequences: methods and challenges. *Briefings in Bioinformatics* 13, 669-681.

- Martínez, F., Santos, M., Carretero, F., Marín, F., 2016. *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *J Sci Food Agr* 96, 1934–1944.
- Martínez-García, L., Korthals, G., Brussaard, L., Jørgensen, H., Deyn, G., 2018. Organic management and cover crop species steer soil microbial community structure and functionality along with soil organic matter properties. *Agric Ecosyst Environ* 263, 7–17.
- Moyano, F., E., Manzoni, S., Chenu, C., 2013. Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability: An exploration of processes and models. *Soil Biology & Biochemistry* 59, 72–85.
- Mussatto, S., I., Dragone, D., Roberto, I., C., 2005. Kinetic Behavior of *Candida guilliermondii* Yeast during Xylitol Production from Brewer's Spent Grain Hemicellulosic Hydrolysate. *Biotechnology Progress* 21 (4), 1352–1356.
- Osorio, N., Habte, M., 2001. Synergistic Influence of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus and a P Solubilizing Fungus on Growth and P Uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res Manag* 15, 263–274.
- Palaniyandi, S., Yang, S., Zhang, L., Suh, J.-W., 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 9621–9636.
- Pérez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C., Steinberg, C., 2006. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology Biochem* 38, 460–470.
- Philippot, L., Raaijmakers, J., Lemanceau, P., Putten, W., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 11, 789–799.
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., Crecchio, C., 2015. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fert Soils* 51, 403–415.
- Piromyong, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teaumroong, N., 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *Eur J Soil Biol* 47, 44–54.
- Ploetz, R., 2015. Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Prot* 73, 7–15.
- Ploetz, R., Kema, G., Ma, L.-J., 2015(a). Impact of Diseases on Export and Smallholder Production of Banana. *Annu Rev Phytopathol* 53, 1–20.
- Qin, S., Miao, Q., Feng, W.-W., Wang, Y., Zhu, X., Xing, K., Jiang, J.-H., 2015. Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. *Appl Soil Ecol* 93, 47–55.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41, D590–D596.

- Reinhold-Hurek, B., Bunger, W., Burbano, C., S., Sabale, M., Hurek, T., 2015. Roots shaping their microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annual Review of Phytopathology* 53 (1), 403-424.
- Ren, G., Xu, X., Qu, J., Zhu, L., Wang, T., 2016. Evaluation of microbial population dynamics in the co-composting of cow manure and rice straw using high throughput sequencing analysis. *World J Microbiol Biotechnology* 32, 101.
- Ronquim, C., C., 2010. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. Embrapa Monitoramento por Satélite. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Campinas – SP*, 26p.
- Silva, 2017. https://www.arb-silva.de/no_cache/download/archive/qiime/ (acessado em janeiro de 2017).
- Sradnick, A., Murugan, R., Oltmanns, M., Raupp, J., Joergensen, R., 2013. Changes in functional diversity of the soil microbial community in a heterogeneous sandy soil after long-term fertilization with cattle manure and mineral fertilizer. *Appl Soil Ecol* 63, 23–28.
- Steinauer, K., Chatzinotas, A., Eisenhauer, N., 2016. Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? *Ecol Evol* 6, 7387–7396.
- Steinauer, K., Tilman, D., Wragg, P., Cesarz, S., Cowles, J., Pritsch, K., Reich, P., Weisser, W., Eisenhauer, N., 2015. Plant diversity effects on soil microbial functions and enzymes are stronger than warming in a grassland experiment. *Ecology* 96, 99–112.
- Sugiyama, S., Vivanco, J., M., 2010. Pyrosequencing Assessment of Soil Microbial Communities in Organic and Conventional Potato Farms. *Plant disease* 94 (11), 1329-1335.
- Tan, Y., Cui, Y., Li, H., Kuang, A., Li, X., Wei, Y., Ji, X., 2017. Rhizospheric soil and root endogenous fungal diversity and composition in response to continuous *Panax notoginseng* cropping practices. *Microbiol Res* 194, 10–19
- Unite, 2017. <https://unite.ut.ee/repository.php#uchime> (acessado em janeiro de 2017).
- Uparse, 2017. <http://drive5.com/uparse/> (acessado em fevereiro de 2017).
- Wang, B., Yuan, J., Zhang, J., Shen, Z., Zhang, M., Li, R., Ruan, Y., Shen, Q., 2013. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. *Biol Fert Soils* 49, 435–446.
- Wang, H., Guo, C.L., Yang, C.F., Lu, G.N., Chen, M.Q., Dang, Z., 2016. Distribution and diversity of bacterial communities and sulphate-reducing bacteria in a paddy soil irrigated with acid mine drainage. *J Appl Microbiol* 121, 196–206.
- Wang, W., Wang, C., Sardans, J., Min, Q., Zeng, C., Tong, C., Peñuelas, J., 2015. Agricultural land use decouples soil nutrient cycles in a subtropical riparian wetland in China. *Catena* 133, 171–178.
- Wu, Y., Zhao, C., Farmer, J., Sun, J., 2015. Effects of bio-organic fertilizer on pepper growth and *Fusarium* wilt biocontrol. *Sci Hortic-amsterdam* 193, 114–120.

- Xu, S., Lu, W., Liu, Y., Ming, Z., Liu, Y., Meng, R., Wang, H., 2017. Structure and diversity of bacterial communities in two large sanitary landfills in China as revealed by high-throughput sequencing (MiSeq). *Waste Manage* 63, 41–48.
- Xue, C., Penton, C., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., Ruan, Y., Shen, Q., 2015. Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Sci Rep-uk* 5, 11124.
- Yadav, A., 2017. Plant Microbiomes and Its Beneficial Multifunctional Plant Growth Promoting Attributes. *Int J Environ Sci Nat Resour* 3 (1).
- Yang, Z., Yang, W., Li, S., Hao, J., Su, Z., Sun, M., Gao, Z., Zhang, C., 2016. Variation of Bacterial Community Diversity in Rhizosphere Soil of Sole-Cropped versus Intercropped Wheat Field after Harvest. *Plos One* 11, e0150618.
- Yu, H., Zeng, G., Huang, H., Xi, X., Wang, R., Huang, D., Huang, G., Li, J., 2007. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation* 18, 793–802.
- Zhang, H., Li, G., Song, X., Yang, D., Li, Y., Qiao, J., Zhang, J., Zhao, S., 2013. Changes in soil microbial functional diversity under different vegetation restoration patterns for Hulunbeier Sandy Land. *Acta Ecol Sinica* 33, 38–44.
- Zhang, W., Chen, L., Zhang, R., Lin, K., 2016. High throughput sequencing analysis of the joint effects of BDE209-Pb on soil bacterial community structure. *J Hazard Mater* 301, 1–7.
- Zhang, X., Zhong, Y., Yang, S., Zhang, W., Xu, M., Ma, A., Zhuang, G., Chen, G., Liu, W., 2014. Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production. *Bioresource Technology* 170, 183–195.
- Zhao, K., Penttinen, P., Chen, Q., Guan, T., Lindström, K., Ao, X., Zhang, L., Zhang, X., 2012. The rhizospheres of traditional medicinal plants in Panxi, China, host a diverse selection of actinobacteria with antimicrobial properties. *Appl Microbiol Biot* 94, 1321–1335.
- Zhou, Y., Selvam, A., Wong, J., 2016. Effect of Chinese medicinal herbal residues on microbial community succession and anti-pathogenic properties during co-composting with food waste. *Bioresource Technol* 217, 190–199.

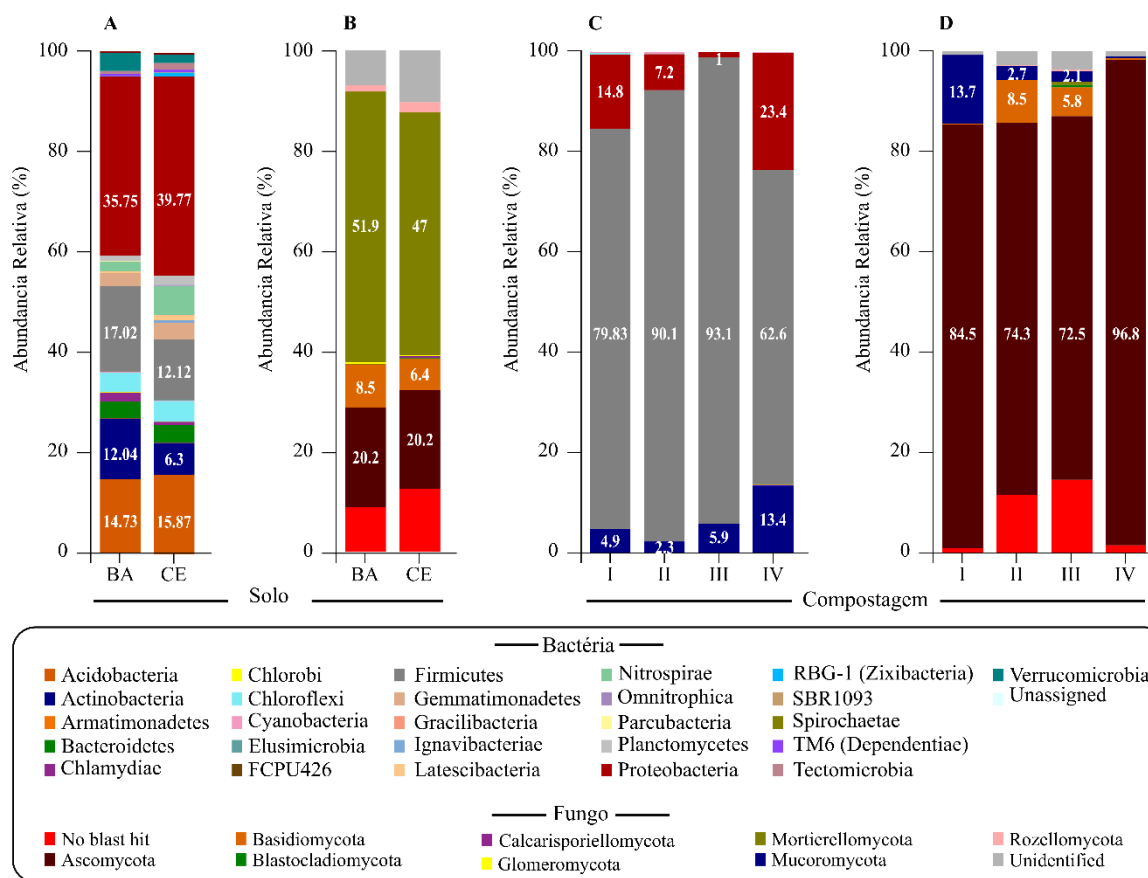
7. Apêndices

Apêndice A - Parâmetros ambientais avaliados nas amostras estudadas.

		Solo											
Estados	Amostras	g/dm ³		mg/dm ³	mmolc/dm ³			mmolc/dm ⁻³	%				
		pH	OM	P	K	Ca	Mg	CTC	V%				
Bahia	Ba1	6,2	13	44	1,5	15	4	36	68				
	Ba2	6,5	22	83	2,9	22	7	47	68				
	Ba3	6,3	15	29	1,2	14	14	44	43				
	Ba4	7,4	17	52	3,4	61	10	87,4	85,1				
Ceará	Ce1	6,5	22	90	3,5	22	8	50	68				
	Ce2	7,4	18	40	3,5	55	11	84,5	82,2				
	Ce3	7,0	24	110	4,1	47	8	74	80				
	Ce4	6,8	5	69	2,1	35	8	61	74				

		Compostagem														
Fases	pH	g/dm ³													%	
		MO	P	K	Ca	Mg	N	S	Zn	Fe	Mn	Na	B	C/N	U	
I	7,8	74,5	20,1	38	66,3	6,2	26	6,3	0,4	4,6	0,6	2,4	0,05	5,2	50,7	
II	7,8	86,7	19,6	38	54	5,7	28	6,3	0,5	4,8	0,5	2,84	0,05	5,6	44,3	
III	8,1	97	22,1	41	56,2	6,5	28	6,1	0,5	4,5	0,4	2,96	0,05	6,3	38	
IV	8,8	71,8	20,8	28	59,8	5,8	22	0,3	0,4	4,6	0,5	2,44	0,04	5,9	14	

Análise cedida pela empresa Sítio Barreiras Ltda.



Apêndice B - Abundância relativa dos filões de bactérias (A e C) e fungos (B e D) nas amostras de solo rizosférico de bananeira de dois Estados Brasileiros (BA: Bahia; CE: Ceará) e em quatro fases de um sistema de compostagem (I, II, III, IV).

Apêndice C - Principais organismos descritos associados à cultura da bananeira.

	Gênero	Agente de biocontrole	(Micro)Organismo alvo	Referência
Bactéria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Foc</i> *	Xue et al., 2015
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> ssp.	<i>Foc</i>	Pushpavathi et al., 2016
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Radopholus similis</i>	http://www.promusa.org/Radopholus+similis ; Pushpavathi et al., 2015
	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	<i>Foc</i>	Getha & Vikineswary 2002; Getha et al., 2005
	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Foc</i>	Tan et al., 2015
Fungo	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> ssp.	<i>Foc</i>	Pushpavathi et al., 2016
		<i>Trichoderma viride</i>	<i>Foc</i>	Pushpavathi et al., 2015
	<i>Paecilomyces</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Radopholus similis</i>	http://www.promusa.org/Radopholus+similis
		<i>Paecilomyces oxalicum</i>	<i>Radopholus similis</i>	http://www.promusa.org/Radopholus+similis
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium anaticum</i>	<i>Radopholus similis</i>	http://www.promusa.org/Radopholus+similis
		<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>Radopholus similis</i>	http://www.promusa.org/Radopholus+similis
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Radopholus similis</i>	http://www.promusa.org/Radopholus+similis

**Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Apêndice D - Gêneros de bactérias (16S) e de fungos (ITS1) mais abundantes dentre todos identificados com abundância relativa superior a 0.5%.

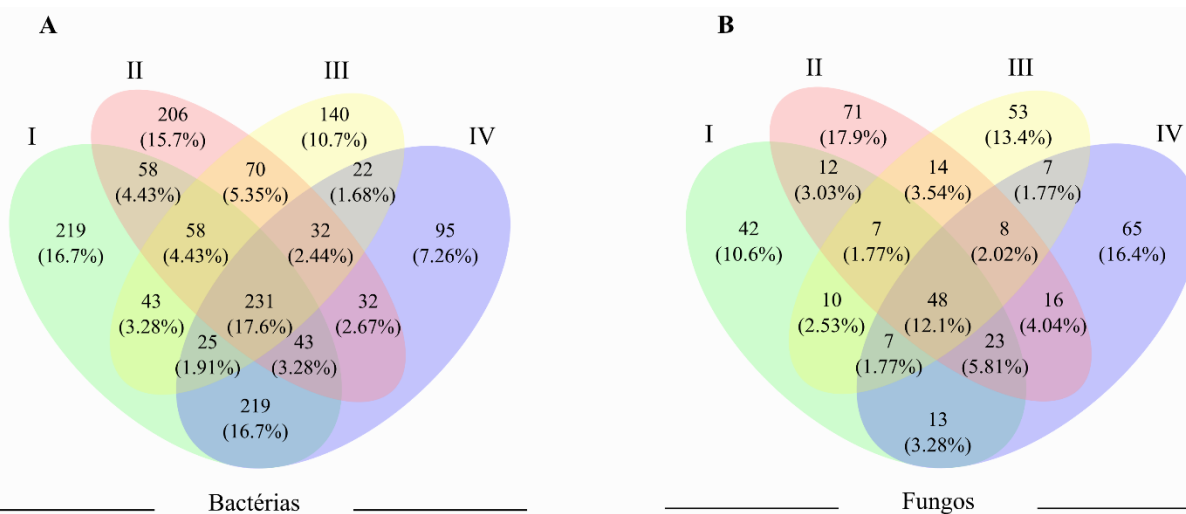
Gêneros	16S						Gêneros	ITS1					
	Abundância Relativa (%)							Abundância Relativa (%)					
	Bahia	Ceará	I	II	III	IV		Bahia	Ceará	I	II	III	IV
<i>Mycobacterium</i>	1.1	0.1	-	-	-	-	<i>Westerdykella</i>	0.8	0.4	-	-	-	-
<i>Acidothermus</i>	1.1	0.1	-	-	-	-	<i>Lepidosphaeria</i>	0.1	1.4	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i>	0.8	0.5	-	-	-	-	<i>Aspergillus</i>	2.9	1.1	0.3	1.9	1.8	0.7
<i>Flavobacterium</i>	0.1	1.7	-	-	-	-	<i>Knufia</i>	1.3	0	-	-	-	-
<i>Terrimonas</i>	0.7	0.4	-	-	-	-	<i>Fusarium</i>	0.4	0.7	-	-	-	-
<i>Bacillus</i>	8.9	6.2	7.4	48	28.5	11.4	<i>Verticillium</i>	0.9	0	-	-	-	-
<i>Oceanobacillus</i>	0.9	0.3	0.4	3.6	20.4	12.6	<i>Phialemoniopsis</i>	1.0	0	-	-	-	-
<i>Ammoniphilus</i>	1.0	0.8	-	-	-	-	<i>Ganoderma</i>	5.8	0.6	-	-	-	-
<i>Paenibacillus</i>	0.8	0.8	-	-	-	-	<i>Rhodotorula</i>	1.3	0.7	-	-	-	-
<i>Sporosarcina</i>	0.9	0.6	40.2	7.0	0.4	0	<i>Mortierella</i>	51.8	46.8	-	-	-	-
<i>Nitrospira</i>	1.0	3.1	-	-	-	-	<i>Preussia</i>	-	-	0.2	5.9	0.5	0.2
<i>Bradyrhizobium</i>	0.7	0.4	-	-	-	-	<i>Candida</i>	-	-	82.6	42.4	20.3	0.8
<i>Pedomicrobium</i>	0.6	0.9	-	-	-	-	<i>Debaryomyces</i>	-	-	0	3.1	17	0.3
<i>Rhizomicrobium</i>	1.4	0.5	-	-	-	-	<i>Pisolithus</i>	-	-	0.1	5.9	3.9	0.2
<i>Variibacter</i>	1.8	1.4	-	-	-	-	<i>Rhizomucor</i>	-	-	13.7	2.7	2.0	0
<i>Sphingomonas</i>	1.9	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Haliangium</i>	0.6	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aquicella</i>	0.8	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	3.1	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium 1</i>	-	-	4.4	0.5	1.8	0.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gordonia</i>	-	-	0	0	0.4	2.9	-	-	-	-	-	-	-
<i>Georgenia</i>	-	-	0	0	0.2	1.9	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enteractinococcus</i>	-	-	0	0.9	0.5	0.9	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nesterenkonia</i>	-	-	0	0	0.3	2.7	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cerasibacillus</i>	-	-	0.1	2.9	2.9	0.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gracilibacillus</i>	-	-	0	0.3	2.8	3.0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudogracilibacillus</i>	-	-	0	6.2	3.0	1.3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sinibacillus</i>	-	-	0.5	8.8	3.0	1.0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Jeotgalicoccus</i>	-	-	6.1	0.1	0.2	0.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salinicoccus</i>	-	-	0	0.2	1.2	0.5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	-	-	1.6	0.1	0.1	0.9	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i>	-	-	1.6	0.1	1.0	0	-	-	-	-	-	-	-

<i>Caldicoprobacter</i>	-	-	2.4	1.6	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidimicrobium</i>	-	-	1.2	1.6	0.5	0.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenalcaldigenes</i>	-	-	0	1.8	0	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oceanisphaera</i>	-	-	3.1	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aliidiomarina</i>	-	-	0	0	0	5.5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Halomonas</i>	-	-	0	0.3	0.8	15.2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychrobacter</i>	-	-	7.9	0.5	0	0	-	-	-	-	-	-	-

Apêndice E - Gêneros identificados únicos e compartilhados entre as diferentes amostras de solo rizosférico e da fase IV da compostagem.

Amostras	Gêneros bacterinaos	Gêneros fúngicos
Bahia	<i>Blastococcus</i> , <i>Geodermatophilus</i> , <i>Lysinimonas</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Actinoallomurus</i> , <i>Flavitalea</i> , <i>Niabella</i> , <i>Mucilaginicoccus</i> , <i>Pedobacter</i> , <i>Thermosporothrix</i> , <i>Lysinibacillus</i> , <i>Turcibacter</i> , <i>Phenylobacterium</i> , <i>Microvirga</i> , <i>Roseiarcus</i> , <i>Pseudolabrys</i> , <i>Acidicaldus</i> , <i>Acidiphilium</i> , <i>Acidisphaera</i> , <i>Dongia</i> , <i>Skermanella</i> , <i>Altererythrobacter</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Burkholderia-Paraburkholderia</i> , <i>Sphaerotilus</i> , <i>Variovorax</i> , <i>Polyangium</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Steroidobacter</i>	<i>Dictyocheirospora</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Cladophialophora</i> , <i>Rasamsonia</i> , <i>Auxarthron</i> , <i>Scytalidium</i> , <i>Myxocephala</i> , <i>Chalara</i> , <i>Knufia</i> , <i>Isaria</i> , <i>Petriellopsis</i> , <i>Pseudallescheria</i> , <i>Phialemoniopsis</i> , <i>Halorosellinia</i> , <i>Xylaria</i> , <i>Cystolepiota</i> , <i>Psilocybe</i> , <i>Catenaria</i>
Ceara	<i>Chryseobacterium</i> , <i>Dinghuibacter</i> , <i>Hydrogenispora</i> , <i>Lachnoclostridium</i> , <i>Sporomusa</i> , <i>Leptospirillum</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Azohydromonas</i> , <i>Pelomonas</i> , <i>Sulfurifustis</i> , <i>Polycyclovorans</i> , <i>Pedosphaera</i>	<i>Botryosphaeria</i> , <i>Teratosphaeria</i> , <i>Jahnula</i> , <i>Stagonospora</i> , <i>Periconia</i> , <i>Ascobolus</i> , <i>Leptodiscella</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Fusicolla</i> , <i>Naganishia</i> , <i>Calcarisporiella</i> , <i>Leiothecium</i>
Fase IV	<i>Gordonia</i> , <i>Georgenia</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Leucobacter</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Nesterenkonia</i> , <i>Sanguibacter</i> , <i>Longispora</i> , <i>Saccharomonospora</i> , <i>Nocardiosis</i> , <i>Truepera</i> , <i>Caldalkalibacillus</i> , <i>Cerasibacillus</i> , <i>Gracilibacillus</i> , <i>Lentibacillus</i> , <i>Virgibacillus</i> , <i>Jeotgalicoccus</i> , <i>Salinicoccus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Melghirimyces</i> , <i>Alkalibacterium</i> , <i>Atopostipes</i> , <i>Caldicoprobacter</i> , <i>Tepidimicrobium</i> , <i>Azoarcus</i> , <i>Marinimicrobium</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Defluviitoga</i>	<i>Preussia</i> . <i>Candida</i> . <i>Debaryomyces</i> . <i>Pisolithus</i> . <i>Rhizomucor</i>
Bahia + Ceará	<i>Bryobacter</i> , <i>Iamia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Acidothermus</i> , <i>Paenarthrobacter</i> , <i>Luedemannella</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Gaiella</i> , <i>Solirubrobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Flavisolibacter</i> ,	<i>Phoma</i> , <i>Westerdykella</i> , <i>Lepidosphaeria</i> , <i>Rousoella</i> , <i>Phialophora</i> , <i>Talaromyces</i> , <i>Metacordyceps</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Stachybotrys</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scedosporium</i> , <i>Pestalotiopsis</i> ,

	<i>Niastella, Parafilimonas, Terrimonas, Neochlamydia, Roseiflexus, Alicyclobacillus, Tumebacillus, Brevibacillus, Cohnella, Kurthia, Sporosarcina, Gemmatimonas, Nitrospira, Gemmata, Pirellula, Planctomyces, Hirschia, Woodsholea, Bradyrhizobium, Devosia, Hyphomicrobium, Pedomicrobium, Rhodomicrobium, Rhodoplanes, Mesorhizobium, Ensifer, Rhizobium, Bauldia, Nordella, Rhizomicrobium, Variibacter, Reyranelia, Sphingomonas, Sphingopyxis, Acidovorax, Piscinibacter, Massilia, Noviherbaspirillum, Vogesella, Bdellovibrio, Anaeromyxobacter, Haliangium, Phaselicystis, Sorangium, Aquicella, Coxiella, Pseudomonas, Arenimonas, Lysobacter, Acidibacter, Opitutus, Chthoniobacter, Luteolibacter</i>	<i>Stromatoneurospora, Geastrum, Ganoderma, Trechispora, Rhodotorula, Geminibasidium</i>
Bahia + Fase IV	<i>Pseudogracilibacillus, Sinibacillus</i>	-
Ceara + Fase IV	-	-
Bahia + Ceara + Fase IV	<i>Bacillus, Oceanobacillus, Ammoniphilus, Paenibacillus</i>	<i>Aspergillus, Penicillium, Mortierella</i>



Apêndice F - Diagrama de Venn mostrando as OTUs únicas e compartilhadas entre as áreas do solo rizosférico da Bahia e do Ceará (A – Bactéria, B – Fungo), com as suas respectivas porcentagens; e das quatro fases da compostagem (C – Bactérias, D – Fungos).

Capítulo 2

Isolamento e caracterização de actinobactérias de solo sob cultivo de bananeira e de composto orgânico com potencial para o controle de patógenos

Resumo

As doenças microbianas causadas por fungos e bactérias são responsáveis por inúmeras perdas econômicas no setor agropecuário. Neste cenário o surgimento de microrganismos resistentes a agroquímicos têm criado uma necessidade urgente de descoberta de novas ‘drogas’ antimicrobianas de origem natural. Uma das fontes mais promissoras e produtoras de novos antibióticos são bactérias do filo Actinobacteria. Este filo engloba bactérias Gram positivas amplamente distribuídas na natureza. Neste trabalho, 62 actinobactérias foram isoladas e caracterizadas fenotipicamente e em nível molecular. A partir das análises foram identificados 5 gêneros: *Pseudonocardia* (8), *Brevibacterium* (1), *Streptomyces* (50), *Kitasatospora* (2) e *Micrococcus* (1). O potencial antagonista dos isolados foi avaliado pelo teste de cultura pareada contra os fungos filamentosos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), *Colletotrichum lindemuthianum* raça 89 (CL) e *Fusarium oxysporum* (FO) ATCC 48112. Doze isolados inibiram o crescimento do *Foc*, 44 o do CL, 11 do FO, com dez destes isolados apresentando atividade antagonista contra estes três fungos. A fim de explorar o efeito destes microrganismos contra o fungo *Foc* especificamente, a verificação da ação dos metabólitos na germinação e desenvolvimento das colônias foi avaliada pelo teste de difusão em meio de cultura dos metabólitos produzidos pelos 12 isolados pelo teste com papel celofane. Os resultados revelaram diferentes padrões de ação dos metabólitos sobre a germinação e crescimento das colônias, sendo constatada a total inibição da germinação dos conídios de *Foc* em placas com a difusão dos metabólitos dos isolados CAB-C 24, CAB-C 25, CAB-C 50 e CAB-S 69. Para a verificação do espectro de ação dos metabólitos produzidos pelas actinobactérias mais promissoras, os extratos aquosos provenientes dos doze isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces* que inibiram *Foc*, foram avaliados contra a levedura *Candida albicans* ATCC 18804, a bactéria Gram negativa *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 1 Shope ATCC 27088 (APP) e a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. O extrato bruto do isolado CAB-C 50 apresentou atividade inibitória contra *C. albicans*, o dos isolados CAB-C 24, CAB-S 66, CAB-S 67, CAB-S 69, CAB-S 71, CAB-S 72 e CAB-S 96 contra APP e o dos isolados CAB-C 24, CAB-C 25, CAB-S 67,

CAB-S 69 e CAB-S 70 mostraram atividade contra *S. aureus*. Assim, dentre as actinobactérias isoladas e identificadas neste trabalho, há isolados promissores para o controle biológico de fitopatógenos assim como potenciais produtores de antibióticos com espectro de ação contra diferentes microrganismos patogênicos de humanos e animais.

1. Introdução

As actinobactérias, bactérias Gram positivas com um alto conteúdo de guanina e citosina (%GC) em sua maioria (Solano et al., 2009; Chandra & Chater, 2013), são consideradas as fontes mais prolíficas de metabólitos secundários conhecidas até o momento, o que inclui compostos de ação antitumoral, herbicidas, bactericidas, fungicidas, biofertilizantes e ainda podem atuar eficientemente na biorremediação de áreas contaminadas além de serem responsáveis por cerca de 45% dos antibióticos descobertos e utilizados na atualidade, o que é reflexo do seu extenso conteúdo genético, *clusters* de genes relacionados a diferentes vias biossintéticas, com espectro amplo de atividades biológicas, aplicáveis a agricultura e indústria farmacêutica, por exemplo (Hamedi et al., 2015; Azarakhsh et al., 2017; Betancur et al., 2017; Aparicio et al., 2018; Kemung et al., 2018).

As actinobactérias apresentam uma ampla diversidade de formas e funções ecológicas, além de expressiva distribuição e gama de hospedeiros, sendo encontradas nos mais variados habitats e em associação com distintos organismos (Ventura et al., 2007; Solano et al., 2009; Chandra & Chater, 2013; Cheah et al., 2015). Estas bactérias pertencem ao filo Actinobacteria, o qual compreende seis classes: Rubrobacteria, Thermoleophilia, Coriobacteriia, Acidimicrobiia, Nitrospirae e Actinobacteria, esta última por sua vez, representando mais de 80% das famílias/gêneros já conhecidos deste filo, e a significativa parte dos produtores de antibióticos já descritos (Bérdy, 2005; Ludwig et al., 2012).

O uso intensivo de antibióticos tem desencadeado, como consequência, preocupações em âmbito da saúde pública (Alvarez et al., 2017; Fisher et al., 2018; Kemung et al., 2018). Bactérias multirresistentes surgem em decorrência do uso constante de antibióticos e são responsáveis por diferentes quadros de infecção nosocomial em todo o mundo, juntamente com doenças fúngicas sistêmicas em humanos, e isso cada vez mais tem apontado para a necessidade urgente em descobrir novos compostos capazes de controlar bactérias multirresistentes (Jiang et al., 2018; Kemung et al., 2018; Xu et al., 2018). Além do uso intensivo e indiscriminado de antibióticos, o

uso de defensivos agrícolas para o controle de microrganismos fitopatogênicos tem sido uma preocupação mundial, uma vez que estes representam os contaminantes ambientais mais amplamente distribuídos, atuando como potenciais causadores de efeitos prejudiciais ao ambiente e à saúde humana (Zhang et al., 2013; Alvarez et al., 2017; Aparicio et al., 2018a).

Culturas agrícolas de grande importância econômica são afetadas por diferentes fatores que acarretam em perdas significativas de produção, como os fitopatógenos (Wairegi et al., 2010; Wang et al., 2013). As doenças causam mais danos em produções agrícolas que todos os fatores abióticos juntos, e as causadas por fungos estão entre as de maior impacto na produção agrícola (Ploetz et al., 2015a; Fisher et al., 2018). O fungo *Fusarium oxysporum* é responsável por causar marchas vasculares em diferentes espécies vegetais, sendo a espécie mais comum deste gênero (Pietro et al., 2003). E a *formae speciales cubense* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* - *Foc*) é um dos maiores importes desta espécie, o qual é agente etiológico da doença mal-do-Panamá, doença responsável por causar perdas significativas na produção de banana em âmbito mundial (Wang et al., 2013; Ploetz et al., 2015a; Dita, 2018). Diante disso, instituições têm buscado alternativas para potencializar a produção agrícola, fazendo uso de práticas acessíveis para os diferentes grupos produtores, sustentáveis e ecologicamente corretas, como a utilização de microrganismos no controle biológico e promoção de crescimento vegetal (Palaniyandi et al., 2013; Zhang et al., 2017).

Nesse contexto, diferentes ambientes têm sido estudados em busca de espécies bacterianas, especialmente de actinobactérias capazes de produzir diferentes compostos com potencial biotecnológico, com ação antimicrobiana frente a diferentes microrganismos resistentes aos antibióticos atualmente utilizados (Cheah et al., 2015; Mahmoud & Kalendar, 2016; Arocha-Garza et al., 2017; Qeshmi et al., 2018; Xu et al., 2018), como também com potencial para biorremediação de áreas contaminadas com agroquímicos, representando uma tecnologia sustentável e ecologicamente correta (Kang et al., 2016; Alvarez et al., 2017; Peng et al., 2018). Na região rizosférica, por exemplo, um dos filos dominantes é o Actinobactéria, o qual apresenta diferentes grupos de bactérias que desempenham variadas funções (Palaniyandi et al., 2013; Philippot et al., 2013) e este é frequentemente explorado quanto ao seu potencial biotecnológico e antagonismo contra diferentes microrganismos patogênicos de humanos, animais e plantas (Palaniyandi et al., 2013; Philippot et al., 2013; Alekhya & Gopalakrishnan, 2017).

Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e selecionar actinobactérias de amostras de solo de cultivo de bananeira comercial e de um composto orgânico utilizado para a adubação do solo com atividade antagonista contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium oxysporum*; o fungo patógeno oportunista humano *Candida albicans*, bem como contra as bactérias patogênicas *Actinobacillus pleuropneumoniae* (suíno) e *Staphylococcus aureus* (animal/ humano).

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem e isolamento de actinobactérias

Amostra de solo sob cultivo de bananeira da variedade Grande Naine foi obtida da unidade de produção de bananeira, situada na cidade de Missão Velha - Ceará (latitude: 07° 14' 59" S, longitude: 39° 08' 35" W) e amostra do composto orgânico produzido na unidade de produção localizada em Ponto Novo - Bahia (latitude: 10° 51' 46" S, longitude: 40° 08' 01" W), ambas unidades pertencentes a Empresa Sítio Barreiras - LTDA. Para o isolamento das actinobactérias, três diferentes meios de culturas foram utilizados: 1) BDA (batata dextrose ágar) (infusão de batata, 200 g; 20 g de glicose; 15 g de ágar; pH 7,0, para 1 L de meio de cultura); 2) HVA (Humic Acid-Vitamin Agar) (Hayakawa & Nonomura, 1987 adaptado) com as seguintes modificações: 0,5% de composto orgânico maduro proveniente da área de coleta [peneirado e esterilizado em autoclave previamente], 0,5 g de fosfato dissódico Na_2HPO_4 , cloreto de potássio (KCl) 1,71 g, sulfato de magnésio - heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,05 g, sulfato de ferro (II) - heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,01 g, carbonato de cálcio (CaCO_3) 0,02 g, ágar 18 g, vitaminas do complexo B, pH 7,2 para 1 L de meio de cultura) e 3) CA (Composto ágar) (1% composto orgânico maduro, 15 g ágar, pH 7.0 para um litro de meio de cultura). Todos os três meios foram suplementados com 50 mg.L⁻¹ de ciclohexamida.

Para o preparo da suspensão, dez gramas de cada amostra foram diluídos em 90 ml de solução salina (NaCl - 0,85%) esterilizada e mantidos sob agitação por 30 min à temperatura ambiente e diluições seriadas foram preparadas. A partir da amostra inicial, uma alíquota de 100 µL das diluições 10⁻¹ e 10⁻² foram utilizadas para o plaqueamento por *spread plate* (triplicata experimental para cada amostra/diluição) e incubadas a 27 °C. As placas foram acompanhadas diariamente por 15 dias e diferentes morfotipos com características do grupo das actinobactérias (como descrito no item abaixo) foram selecionados e transferidos para meio BDA para a obtenção

de culturas puras. As culturas puras foram mantidas em glicerol 80% a -80 °C. Culturas utilizadas para os demais estudos foram mantidas a -20 °C em glicerol 20% (Kampapongsa & Kaewkla, 2015).

2.2. Caracterização morfológica

As características morfológicas e culturais dos isolados foram determinadas por observação direta em meio de cultura BDA sólido em placa (90 x 15 mm), após pelo menos sete dias de incubação a 27 °C, podendo se estender a 15 dias no máximo. Foi registrada a presença de hifas, micélio aéreo e de esporos quando presentes, por meio de fotografias com auxílio de microscópio invertido (Olympus IX70) e microscópio estereoscópio lupa (Olympus SZ61) com câmera digital acoplada, utilizando o programa QCapture Pro 6.0 (Shirling & Gottlieb, 1966; Hollick, 1995; Kampapongsa & Kaewkla, 2015). A morfologia dos isolados também foi observada em meio de cultura ISP-2 (*International Streptomyces Project*) (Extrato de levedura 4 g, extrato de malte 10 g, dextrose 4 g, ágar 20 g, pH 7,3) (Aouiche et al., 2014).

2.3. Extração de DNA, PCR do DNAr 16S

O DNA total das culturas puras bacterianas obtidas foi extraído utilizando o Kit comercial *FastDNA™ SPIN KIT* (MP Biomedicals) seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade e concentração do DNA obtido foram avaliadas por análise em eletroforese em gel de agarose 0,8% e por espectrofotometria (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific). Uma solução padronizada para a concentração de uso de 25 ng/μL foi preparada para todos os DNAs obtidos.

A região do DNAr 16S de aproximadamente 640 pares de bases (pb) foi amplificada pela técnica de PCR no termociclador Mastercycler® ep, Eppendorf utilizando os *primers* S-C-Act-235-a-S-20 5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3' e S-C-Act-878-a-A-19 5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3' (Stach et al., 2003). Com as seguintes condições de reação: 0,2 μM de cada *primer*, 200 μM da solução de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1X tampão da enzima *Go Taq* DNA polimerase, 1,25 U da enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e 25 ng de DNA em um volume final de 50 μL. Com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 95 °C por 4 min, seguido por desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 62 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 1 min, com estes três últimos passos repetidos 35 vezes e extensão final 72 °C por 7 min (Stach et al., 2003; Bora et al., 2015). Após o término das reações,

5 µL do produto da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (condições da corrida: tampão TBE 1X, 50 min a 90 V) para verificação da presença de *amplicons*.

2.4. Identificação molecular e análise filogenética

Os *amplicons* obtidos para cada isolado foram purificados e sequenciados em ambas as fitas. As sequências *forward* e *reverse* foram analisadas utilizando o programa *Sequencher* v. 5.4 (<https://www.genecodes.com/sequencher>) e comparadas com sequência do gene rDNA 16S no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information, USA*) utilizando a ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local de nucleotídeos (*BlastN* - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar a afiliação taxonômica em nível de gênero. Sequências de referência disponíveis no *GenBank* foram utilizadas para o alinhamento (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o algoritmo *Muscle* (Edgar, 2004) no *software* MEGA v.7 (MEGA, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo de agrupamento da Máxima Verossimilhança no programa CIPRES 2.0 (Miller et al., 2010; CIPRES, 2018), pela análise RAxML (RaxML-HPC v.8 on XSEDE), utilizando o modelo GTR + CAT (Stamatakis, 2014) para a inferência filogenética dos isolados. A topologia resultante da árvore foi construída após 1.000 repetições (*bootstrap* igual a 1.000). A sequência do gene DNAr 16S, correspondente à espécie *Coriobacterium glomerans* (NR_026170.1 – NCBI), pertencente ao Filo Actinobacteria e à família Coriobacteriales, foi utilizada como grupo externo. Uma análise Bayesiana também foi realizada, utilizando a plataforma CIPRES, com 1.000.000 gerações da cadeia de Markov de Monte Carlo, utilizando como modelo evolutivo o HKY+G (*Hasegawa-Kishino-Yano*), e as demais definições: *nruns=2*, *nchains=4*, *samplefreq=500*, *printfreq=1000*, *diagnfreq=5000*, *relburnin=yes*, *burninfrac=0.25*, *stoprule=yes*, *stopval=0.01* ((Miller et al., 2011; CIPRES, 2018).

2.5. Atividade antagonista

2.5.1. Microrganismos teste utilizados

Neste trabalho foram utilizados os microrganismos teste *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolado 54P (*Foc*), doado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina; *Colletotrichum lindemuthianum* A₂-2-3 raça 89 (CL), pertencente à coleção

fúngica do Laboratório de Genética Molecular de Fungos (LGMF)/ Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV); *Fusarium oxysporum* (FO) ATCC 48112 INCQS 40144, pertencente à Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária da Fundação Osvaldo Cruz - Rio de Janeiro, Brasil - FIOCRUZ. A levedura *Candida albicans* ATCC 18804, pertencente à Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), bem como as bactérias *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 1 Shope 4074 (APP) doada pelo professor Paul R Langford Imperial College London (UK) e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 INCQS 00039 pertencente à Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária da Fundação Osvaldo Cruz - Rio de Janeiro, Brasil – FIOCRUZ.

2.5.2. Atividade antifúngica

A atividade antifúngica desempenhada por 62 isolados bacterianos foi testada pelo método de pareamento de culturas (Kampapongsa et al., 2015) contra cada fungo filamentosos teste listado no item anterior. Para o teste com *FOC* e FO, discos de 5 mm de cada isolado de actinobactéria foram previamente inoculados a 5 mm de distância da borda da placa de 15 x 60 mm em meio BDA pH 6,0 e as placas incubadas por quatro dias a 27 °C. Após 7 dias de crescimento dos fungos teste, discos de 5 mm destes foram inoculados na placa contendo o disco de actinobactéria previamente inoculado (4 dias antes da inoculação do *Foc* e do FO) na extremidade oposta à actinobactéria. As placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias. Para o teste de pareamento com CL, a inoculação da actinobactéria e do fungo teste foi feita no mesmo dia, incubação feita a 25 °C por 20 dias, com base em testes prévios e tempo de crescimento do fungo teste. Placas não inoculadas com actinobactérias foram utilizadas como controle.

O cálculo do percentual de inibição foi realizado a partir da média das três replicatas biológicas (cada uma contendo triplicata experimental). O crescimento do micélio fúngico foi medido com paquímetro digital (Mitutoyo Absolute DIGIMATIC) e transformado em percentual de inibição (*Percent Inhibition of Radial Growth* – PIRG) pela seguinte fórmula:

$$\text{PIRG} = (R1 - R2 \times 100) / R1$$

Onde: R1 = Taxa de crescimento do fungo na placa controle;

R2 = Taxa de crescimento do fungo na placa teste.

A significância da inibição foi avaliada pelo teste estatístico Scott Knott com $p \leq 0.5\%$ de probabilidade (Kampapongsa & Kaewkla, 2015).

2.5.3 Teste de inibição da germinação de conídios de *FOC* por difusão de metabólitos em meio de cultura

Os isolados positivos para o teste de antagonismo por pareamento de culturas contra *FOC* foram utilizados para avaliar o efeito dos metabólitos produzidos por estes na germinação dos conídios. Papel celofane transparente foi utilizado para evitar o contato direto das actinobactérias com o meio de cultura e permitir a passagem de nutrientes do meio de cultura e metabólitos produzidos pelas actinobactérias. A superfície do meio BDA, pH 6,0, em placas de Petri (90 por 15 mm) foi totalmente recoberta com papel celofane previamente esterilizado e 100 μL de suspensão de cada actinobactéria foram distribuídos por toda a superfície do meio de cultura pela técnica *spread plate*, de modo a cobrir toda a do meio de cultura. As placas foram incubadas a 27 °C por sete dias e, após o crescimento das actinobactérias, cuidadosamente o papel celofane foi retirado com auxílio de uma pinça devidamente esterilizada, levando com ele toda a biomassa bacteriana.

Uma suspensão de esporos (10^3 conídios/mL) de *Foc* foi preparada e 100 μL foram plaqueados sobre a superfície do meio contendo os metabólitos produzidos pelos isolados. As placas foram incubadas a 25 °C e acompanhadas diariamente até completarem sete dias. Registros foram realizados por meio de fotografias com auxílio de microscópio invertido (Olympus IX70) e microscópio estereoscópio lupa (Olympus SZ61) com câmera digital acoplada, utilizando o programa QCapture Pro 6.0. A porcentagem de germinação foi avaliada a partir da contagem do número de esporos germinados. Placas com apenas BDA e *Foc* foram utilizadas como controle e o experimento foi conduzido em triplicata experimental e com três repetições biológicas.

2.5.4 Obtenção do extrato bruto

Os isolados que mostraram atividade antagonista contra o *Foc*, foram repicados em meio BDA e incubados a 27 °C por sete dias. Seis discos de 5 mm de meio de cultura contendo cultura bacteriana foram inoculados em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido BD (Batata, dextrose - HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Ref.: M403-500G, Lot. 000219480), três frascos para cada isolado, e incubados a 27 °C por cinco dias sob agitação a 150 rpm (Aouiche et al., 2014 com modificações). O sobrenadante livre de células foi obtido por centrifugação (3.000

rpm por 15 minutos) em tubos de centrifugas previamente esterilizados e posteriormente liofilizados (Liofilizador L101 da Liotop®). A biomassa celular de cada isolado foi coletada e seca em estufa a 65 °C para obtenção da massa seca. Tanto o produto da liofilização quanto a biomassa seca foram pesados para obter a razão da massa do concentrado do meio de cultura por biomassa bacteriana.

2.5.5 Teste de disco-difusão

O extrato bruto seco foi utilizado para os bioensaios pelo teste de difusão em disco de papel. Para o preparo das soluções de extratos brutos, estes foram previamente pesados, dissolvidos em água milli Q e filtrados em membrana 0,22 µm (Millex® - Syringe-driven Filter). Os extratos obtidos foram impregnados nos discos de papel (6 mm de diâmetro) e padronizados na concentração de 2 mg por disco (Balouiri et al., 2016; Xu et al., 2018). Os microrganismos teste usados foram a levedura *C. albicans*, a bactéria Gram negativa APP e a bactéria Gram positiva *S. aureus*. Os testes foram realizados em triplicata em placas de Petri de 60x15 mm, contendo 10 mL de meio de cultura e em placas de 140x15 mm, contendo 100 mL de meio de cultura. *C. albicans*, APP e *S. aureus* foram cultivadas em meio Ágar Dextrose Saboraund (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Ref. M063-500G, Lot:0000084603), BHI (*Brain Heart Infusion* – Sigma-Aldrich, Ref. 53285-500G, Lot. BCBJ8829V) suplementado com NAD (0,01%) e Mueller-Hilton ágar (Becton Dickinson [BD], Ref. 212322-500G, Lot. 2089488), respectivamente. Após cultivo *overnight*, uma suspensão de células foi preparada e a densidade ótica (DO) ajustada para 0,8. Após o espalhamento das células sobre a superfície do meio de cultura com *swab* (Labor Import Ltda, Código: 4434), os discos impregnados com o extrato foram colocados na superfície do meio (Lee et al., 2012; Odumosu et al., 2017; Xu et al., 2018 com modificações).

Zonas de inibição do crescimento foram medidas após 24 horas de incubação a 30 °C para *C. albicans* e a 37 °C para APP e para *S. aureus* com paquímetro digital (Mitutoyo Absolute DIGIMATIC). Como controle negativo, foram utilizados apenas o disco, água destilada esterilizada para *C. albicans* e solução salina (NaCl - 0.85%) para APP e *S. aureus* e, como controle positivo, nistatina 30 µg (MERCK, Lot. K24126408) para *C. albicans*, tetraciclina 30 µg (Sensidisc, DME, Lot. 2570TET) para APP e ampicilina 10 µg (Sensidisc, DME, Lot. 2558AMP) para *S. aureus*.

3. Resultados

3.1. Isolamento, identificação e caracterização dos isolados

Sessenta e dois isolados foram obtidos a partir do isolamento de amostra de solo sob cultivo de bananeira e de um composto orgânico maduro em três diferentes meios de cultura (Tabela 1). A estes foram atribuídas as siglas CAB-C (Coleção de Actinobacterias de amostra de Composto) e CAB-S (Coleção de Actinobactérias de amostra de Solo). Todos os isolados, além da caracterização morfológica, foram identificados em nível de gênero pelo sequenciamento parcial do gene correspondente ao RNAr 16S, fragmentos de DNA de aproximadamente ~640 pb foram obtidos para todos os isolados (Apêndice B). Cinco gêneros foram identificados: *Pseudonocardia* (8), *Brevibacterium* (1), *Streptomyces* (50), *Kitassatospora* (2) e *Micrococcus* (1).

Os meios de cultura HVA e CA foram os que permitiram isolar uma maior diversidade de gêneros, *Pseudonocardia* sp. (3), *Streptomyces* sp. (26) e *Kitassatospora* sp. (2) no meio HVA; *Pseudonocardia* sp. (5), *Brevibacterium* (1), *Streptomyces* sp (17) e *Micrococcus* sp. (1) no meio CA, e no meio BDA, apenas o gênero *Streptomyces* sp. (7) foi isolado. Assim, o maior número de isolados foi obtido no meio HVA, 31 isolados, seguido pelo CA (24) e, por fim, o meio BDA (7). Em relação às amostras, uma maior diversidade de gêneros foi obtida da amostra de composto orgânico; *Pseudonocardia* sp. (8), *Brevibacterium* (1), *Kitassatospora* sp. (2), *Streptomyces* sp. (15) e *Micrococcus* sp. (1), no solo, houve uma dominância de isolados do gênero *Streptomyces* sp. (35) e apenas 1 *Kitassatospora* sp. A identificação dos isolados, a correspondência molecular com sequências de referências, bem como meio de cultura de isolamento estão listadas na tabela 1.

Apenas dois isolados obtidos não apresentaram estruturas filamentosas, o isolado CAB-C 04 (*Brevibacterium* sp.) e o isolado CAB-C 09 (*Micrococcus* sp.) (Fig. 1). Nos demais, 60 isolados, foi possível observar por microscopia a presença de hifas formando micélio de substrato, hifas aéreas reprodutivas e esporos (Fig. 1). As características morfológicas de um isolado de cada gênero podem ser observadas na figura 1 e, dos demais isolados obtidos neste trabalho, em anexo (Apêndice A).

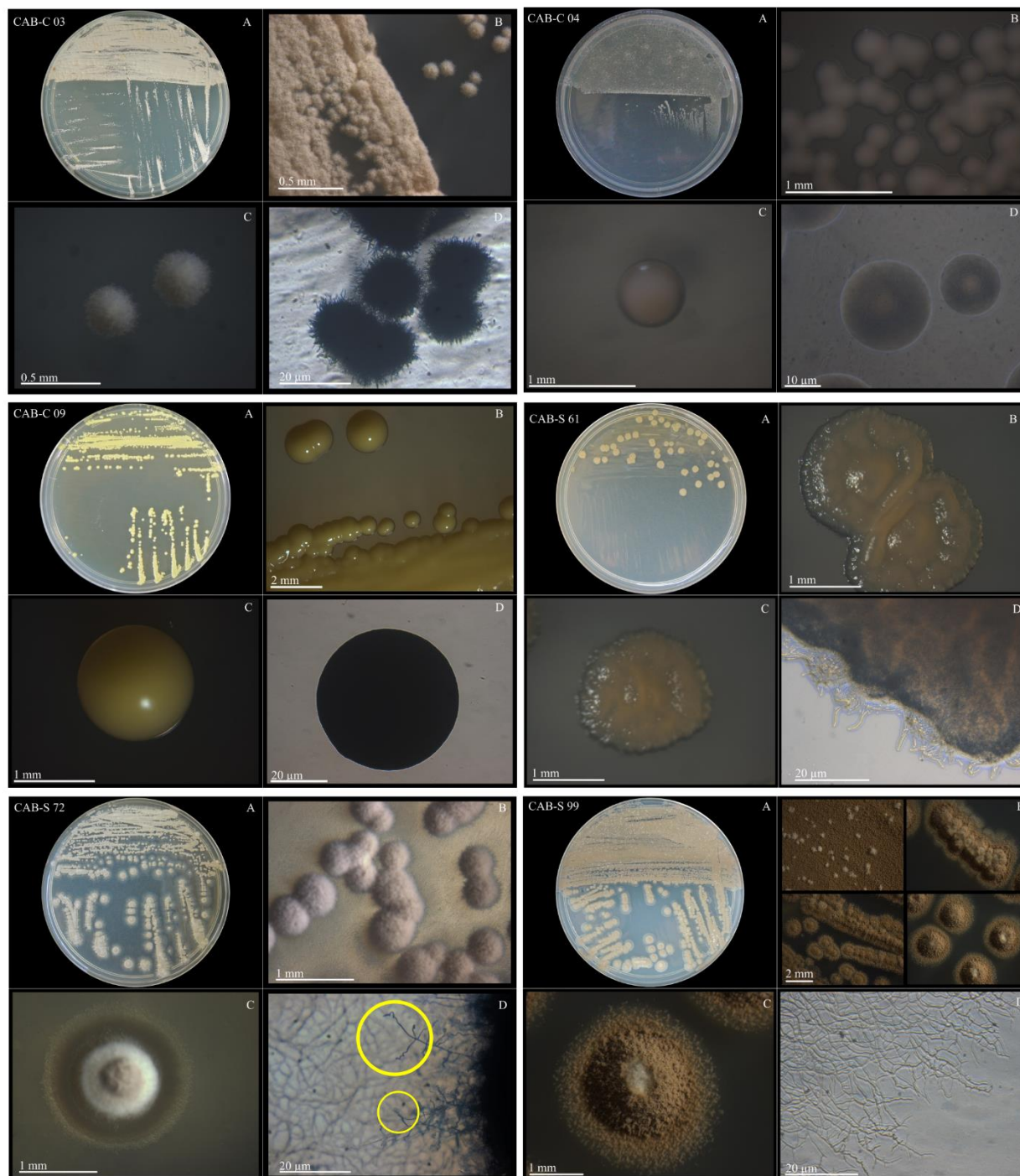
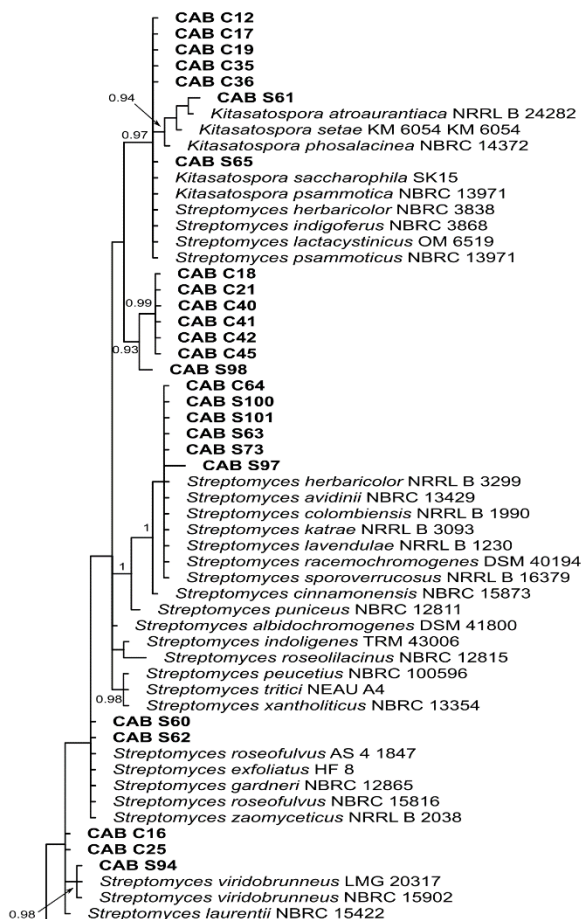


Figura 1: Características morfológicas e culturais de um isolado representante de cada gênero obtido a partir do isolamento. CAB-C 03: *Pseudonocardia* sp.; CAB-C 04: *Brevibacterium* sp.; CAB-C 09: *Micrococcus* sp.; CAB-S 61: *Kitasatospora* sp.; CAB-S 72: *Streptomyces* sp.; CAB- 99: *Streptomyces* sp.. Imagens obtidas com auxílio de microscópio estereoscópio lupa (Olympus SZ61) (imagens B e C) e microscópio invertido (Olympus IX70) (imagem D). A: Isolado cultivado em placa de Petri 90 x 15 mm em meio de cultura BDA. B: Aspecto cultural do isolado em maior aumento. C: Aspecto de uma colônia isolada. D: Aspecto do micélio do isolado. Imagens obtidas com sete dias de cultivo do isolado. Os círculos amarelos indicam a presença de esporos no isolado CABS 72.

Em relação à morfologia, foi possível observar uma variação na coloração do micélio aéreo, principalmente dos isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces*, com presença de alterações eminentes na morfologia e coloração das colônias ao longo do desenvolvimento da cultura (CAB-S 60, CAB-S 62 e isolados CAB-S 80 ver apêndice A).

3.2. Construção da árvore filogenética

A análise filogenética foi realizada utilizando dois métodos diferentes (Neighbor Joining e Bayesiana) com sequências de nucleotídeos de 62 isolados obtidos neste estudo e 79 sequências do rDNA 16S de isolados de referência disponíveis no banco de dados. As análises agruparam os isolados em *clados* bem definidos, e a árvore filogenética gerada pela análise Bayesiana é mostrada na figura 2, com seus respectivos valores de *bootstrap*.



Continua...

Continuação:

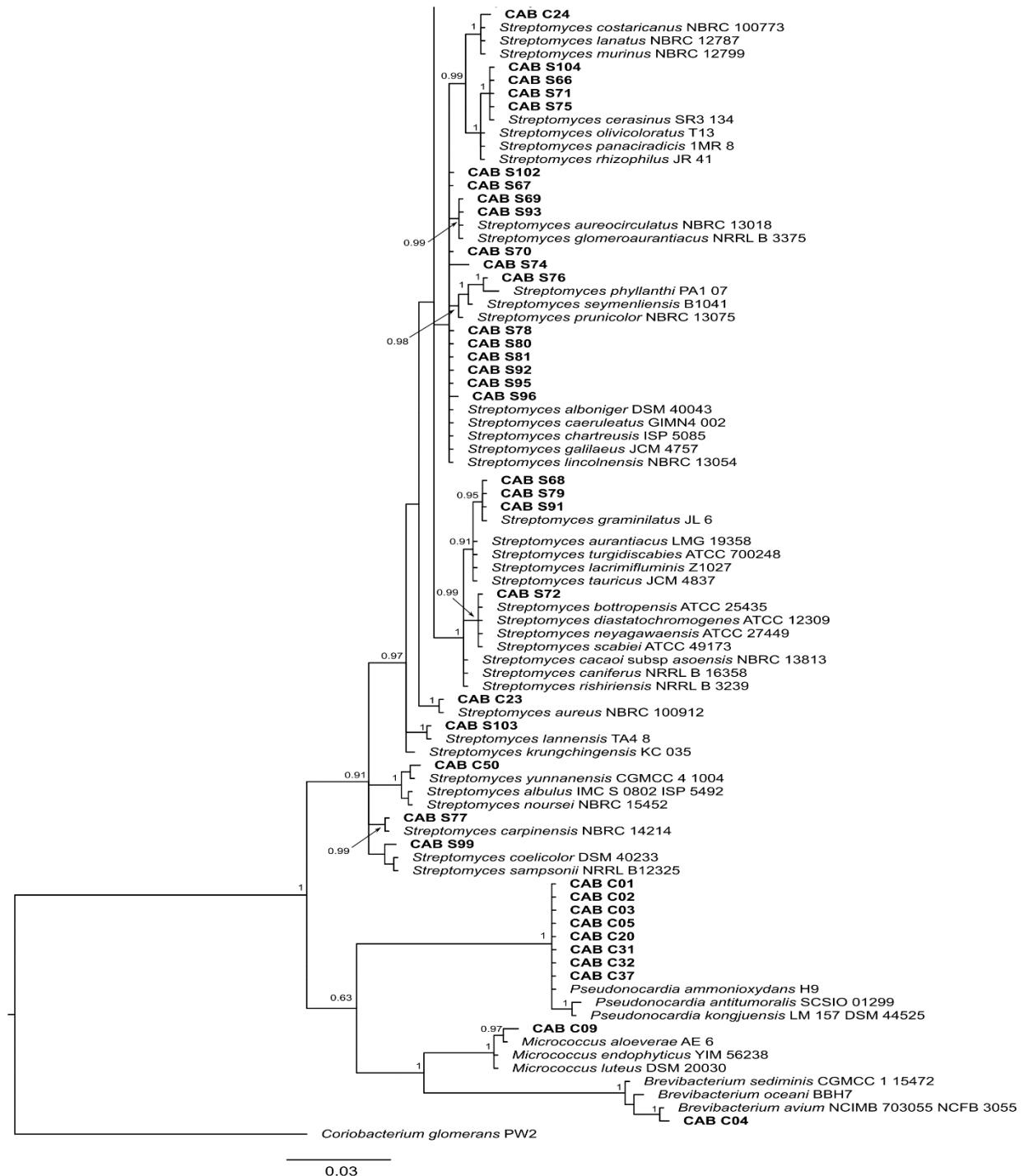


Figura 2: Árvore filogenética gerada pela análise Bayesiana (modelo utilizado HKY+I+G), a partir de sequências do gene DNAr 16S dos isolados pertencentes ao filo Actinobacteria obtidos neste trabalho e de linhagens de referência, obtidos do banco de dados - *GenBank*. Os valores de probabilidade estão na base de cada nó. A espécie *Coriobacterium glomerans* PW2 foi utilizada como grupo externo.

Com a análise filogenética (Fig. 2) é possível verificar a formação de dois grandes *clados*, o primeiro formado pelos isolados agrupados com os gêneros *Pseudonocardia*, *Brevibacterium* e *Micrococcus*, e o segundo formado pelos gêneros *Streptomyces* e *Kitasatospora*. Os 62 isolados foram distribuídos em 20 *clados*, com o suporte bayesiano representado pelos valores na base dos ramos. Seis isolados, CAB-C 18, CAB-C 21, CAB-C 40, CAB-C 41, CAB-C 42 e CAB-C 45, provenientes da amostra do composto orgânico, formaram um *clado* distinto bem suportado pela análise bayesiana (0,99), o que pode corresponder a um novo táxon.

Alguns isolados formaram *clados* bem suportados pela análise bayesiana com uma ou um pequeno grupo de espécies, como por exemplo o isolado CAB-S 76 com a espécie *Streptomyces phyllanthi* (PA1 07), o isolado CAB-C 23 com a espécie *Streptomyces aureus* (NBRC 100912), o isolado CAB-S 103 com a espécie *Streptomyces iannensis* (TA4 8), o CAB-S 77 com a espécie *Streptomyces carpinensis* (NBRC 14214), o isolado CAB-C 09 com o isolado *Micrococcus aloecerae* AE 6 e o isolado CAB-S 72, o qual é filogenicamente próximo a isolados de espécies que podem ser fitopatogênicas (grupo *S. scabiei*), sugerindo uma classificação mais precisa.

A maioria dos isolados obtidos apresentou correspondência molecular com bactérias do gênero *Streptomyces*. Alguns isolados apresentaram relação com o gênero *Kitasatospora*, embora este gênero provavelmente seja sinônimo do gênero *Streptomyces*. Outras análises são necessárias para melhor definir tal correspondência, bem como para a elucidação dos isolados do diferente *clado*, possível nosso táxon.

3.3. Atividade antagonista dos isolados

3.3.1. Teste de pareamento de cultura *in vitro*

A partir da técnica de pareamento de cultura e avaliação da atividade antagonista de 62 isolados contra os três fungos filamentosos (2 fitopatógenos: *Foc* e *C. lindemuthianum* e 1 patógeno oportunista humano: FO), 11 das actinobactérias foram capazes de inibir o crescimento do FO, 12 o do *Foc* e 44 o do CL. Todos os isolados que apresentaram atividade antagonista pertencem ao gênero *Streptomyces*. Dez desses isolados apresentaram atividade antagonista contra os três fungos testes (CAB-C 12, CAB-C 24, CAB-C 25, CAB-C 50, CAB-S 66, CAB-S 67, CAB-S 69, CAB-S 71, CAB-S 72 e CAB-S 96), sendo quatro isolados da amostra de composto orgânico e seis da amostra de solo, sendo os isolados CAB-C 24, 25 e 50 os que apresentaram maior taxa de inibição (Fig. 3, Tabela 2).

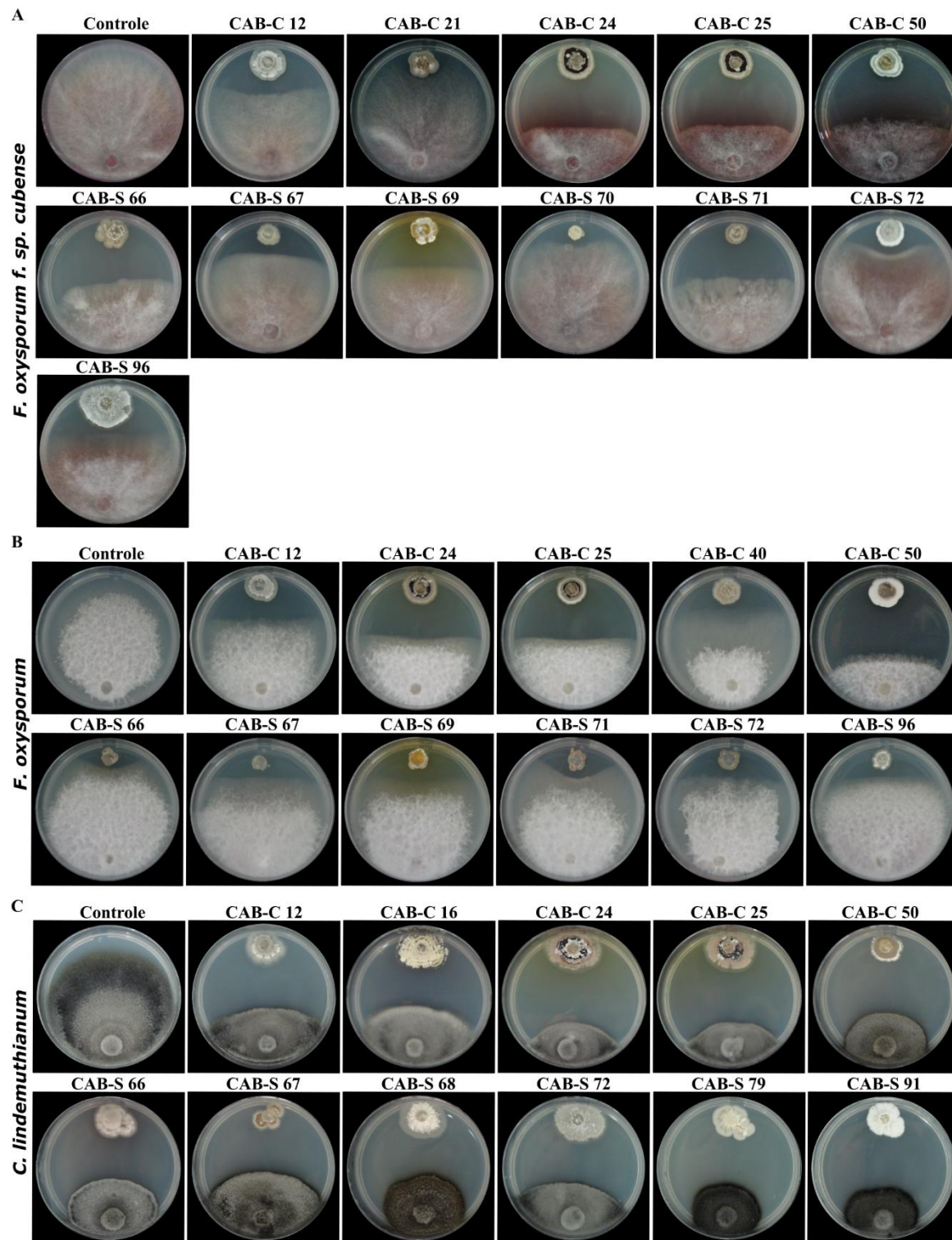


Figura 3. Atividade antagonista *in vitro* de diferentes isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces*. A: Todos os 12 isolados com atividade antagonista contra o *Foc* e o controle *Foc*; B: Todos os 11 isolados com atividade antagonista contra o FO e o controle FO; C: Todos os isolados que apresentaram taxa de inibição igual ou superior a 50% do CL em relação ao controle CL. A avaliação do crescimento foi realizada após 7 dias para *Foc* e FO e 20 dias para o CL. Teste realizado em meio de cultura BDA e incubação a 25 °C.

Tabela 2: Ação inibitória de isolados pertencentes ao filo Actinobacteria contra de três fungos patogênicos.

Isolados	<i>F. oxysporum</i> (FO)		<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> (Foc)		<i>C. lindemuthianum</i> (CL)	
	Crescimento micelial (mm)	Zona de inibição (%)	Crescimento micelial (mm)	Zona de inibição (%)	Crescimento micelial (mm)	Zona de inibição (%)
Controle	48,8a	---**	50,99a	--	37,66a	--
CAB-C 12	30,70b	37,11	29,54d	42,09	16,82e	55,34
CAB-C 16	-*	--	-	--	18,71d	50,33
CAB-C 17	-	--	-	--	26,41c	26,41
CAB-C 18	-	--	-	--	29,57b	21,49
CAB-C 19	-	--	-	--	19,78d	47,49
CAB-C 21	-	--	36,16c	29,1	25,56c	32,14
CAB-C 23	-	--	-	--	25,65c	31,89
CAB-C 24	18,79c	61,5	14,96h	70,68	11,25e	70,14
CAB-C 25	19,77c	59,51	17,11g	66,46	12,44e	66,98
CAB-C 35	-	--	-	--	33,69a	10,54
CAB-C 36	-	--	-	--	21,02d	44,18
CAB-C 40	34,42b	29,47	-	--	26,34c	30,06
CAB-C 41	-	--	-	--	25,02c	33,55
CAB-C 42	-	--	-	--	25,93c	25,15
CAB-C 45	-	--	-	--	25,52c	32,23
CAB-C 50	16,14c	66,94	15,22h	70,15	13,99e	62,86
CAB-S 62	-	--	-	--	29,31b	22,17
CAB-S 64	-	--	-	--	26,18c	30,5
CAB-S 65	-	--	-	--	26,12c	30,64
CAB-S 66	32,96b	32,46	24,94F	51,09	18,75d	50,23
CAB-S 67	35,14b	28	36,1c	29,2	18,46d	50,92
CAB-S 68	-	--	-	--	15,03e	60,1
CAB-S 69	31,94b	34,54	27,1e	46,87	24,53c	34,86
CAB-S 70	-	--	38,86b	24,39	21,29d	43,47
CAB-S 71	33,98b	30,37	27,38e	46,32	21,29d	43,47
CAB-S 72	32,76b	32,87	30,3d	40,58	16,05e	57,39
CAB-S 74	-	--	-	--	31,6b	16,1
CAB-S 75	-	--	-	--	34,48a	8,44
CAB-S 76	-	--	-	--	30,99b	17,72
CAB-S 78	-	--	-	--	32,36a	14,07
CAB-S 79	-	--	-	--	15,51e	58,81
CAB-S 80	-	--	-	--	27,33c	27,44
CAB-S 81	-	--	-	--	24c	36,28
CAB-S 91	-	--	-	--	14,36e	61,88
CAB-S 92	-	--	-	--	23,51c	37,59
CAB-S 93	-	--	-	--	33,23a	11,73
CAB-S 94	-	--	-	--	23,78c	36,87
CAB-S 96	34,85b	28,6	35,02c	31,31	29,40b	21,93
CAB-S 97	-	--	-	--	27,63c	26,65
CAB-S 99	-	--	-	--	19,34d	48,66
CAB-S 100	-	--	-	--	28,28c	24,91
CAB-S 101	-	--	-	--	26,52c	29,58
CAB-S 102	-	--	-	--	30,07b	20,15
CAB-S 103	-	--	-	--	25,56c	32,14
CAB-S 104	-	--	-	--	32,88a	12,69

Letras iguais dentro de cada coluna não diferem estatisticamente ($p \leq 0.5\%$), de acordo com o teste de Scott Knott.

*Crescimento igual ao controle; ** Sem atividade inibitória observada.

3.1.2. Teste de germinação de conídios com *Foc* por difusão de metabólitos

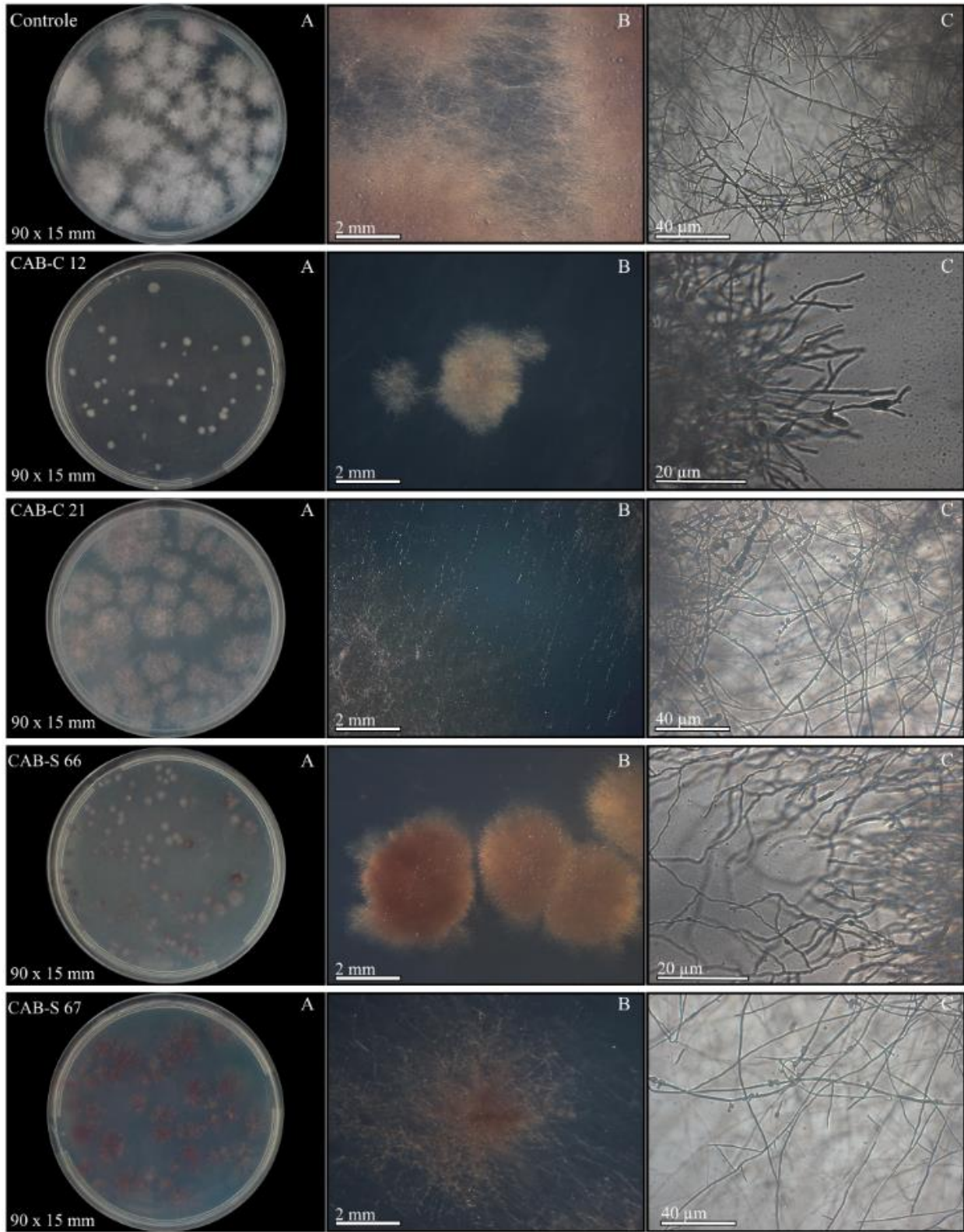
O teste de germinação de conídios com o fungo fitopatogênico *Foc* foi realizado utilizando todos os 12 isolados que mostraram atividade antagonista no teste de pareamento de culturas, todos pertencentes ao gênero *Streptomyces*. As substâncias produzidas por todos os isolados

apresentaram algum efeito sobre a germinação de conídios e morfologia das colônias fúngicas. Os isolados CAB-C 25, CAB-C 50 e CAB-S 69 inibiram totalmente a germinação dos conídios (Tabela 3). O isolado CAB-C 24 inibiu quase totalmente a germinação, foi observado inibição pós germinação, com a formação de um tubo germinativo “aberrante” (Fig. 4). Os isolados CAB-C 12, CAB-S 66, CAB-S 67, CAB-S 70, CAB-S 71 e CAB-S 72 mostraram inibição do desenvolvimento das colônias, com variações no tamanho das colônias, na morfologia das hifas e na produção de pigmentação do *Foc*, bem como na germinação de conídios. Os isolados CAB-C 21 e CAB-S 96 apresentaram visualmente uma menor alteração na produção de micélio, quando comparados ao controle, embora apresentando diferença na germinação de conídios (Fig. 4).

Tabela 3: Análise da germinação de conídios de *Foc* após a inoculação em meio BDA na presença das substâncias produzidas pelas actinobactérias isoladas neste trabalho.

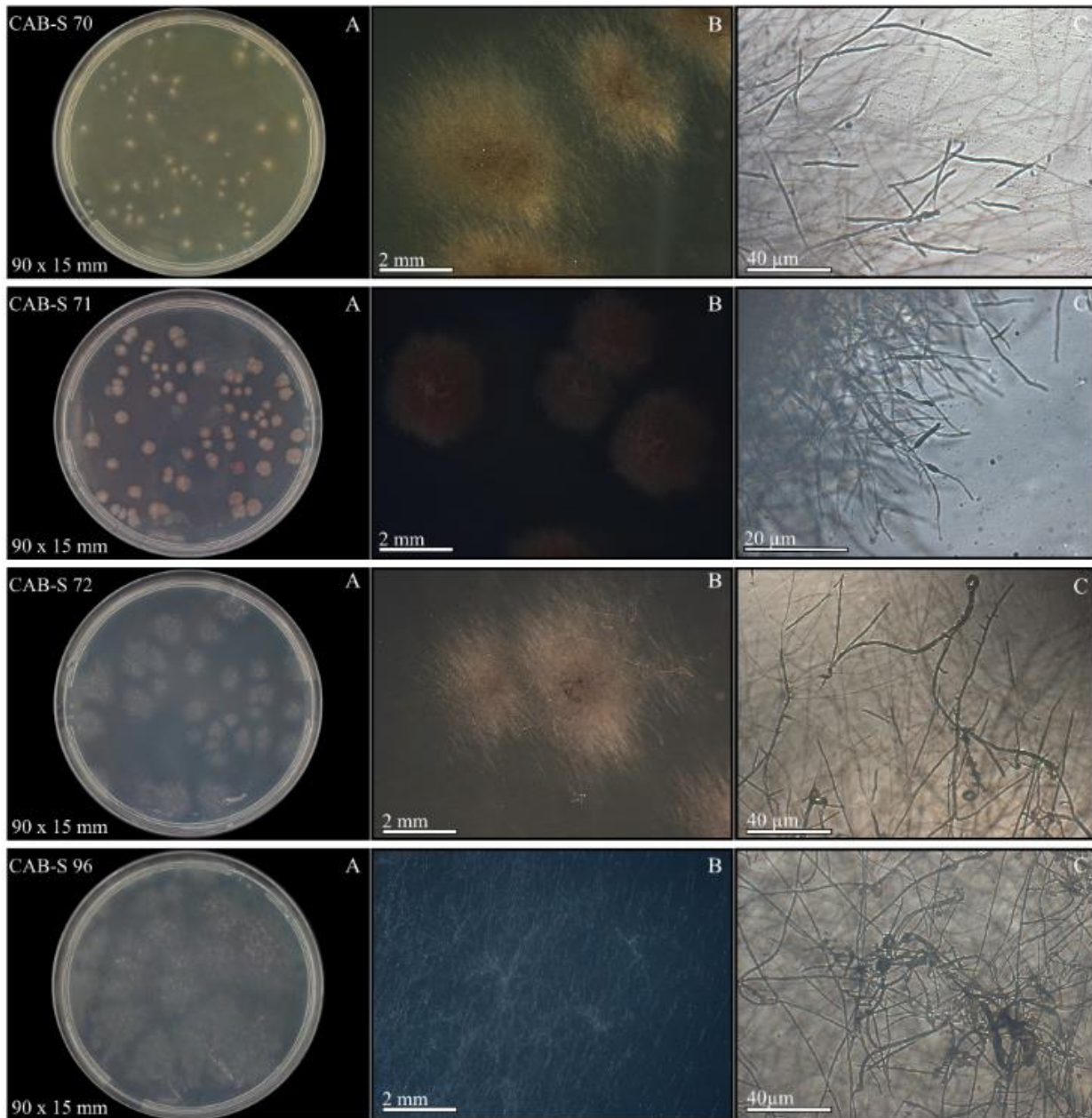
Isolados	Tempo de germinação após a inoculação (dias)	Número de conídios germinados	Taxa de germinação (%)
Controle	2	62	100
CAB-C 12	6	38	62.1
CAB-C 21	2	43	69.4
CAB-C 24	-	0	-
CAB-C 25	-	0	-
CAB-C 50	-	0	-
CAB-S 66	3	59	95.2
CAB-S 67	2	42	67.7
CAB-S 69	-	0	-
CAB-S 70	3	58	93.5
CAB-S 71	3	61	98.4
CAB-S 72	3	28	45.9
CAB-S 96	2	25	40.3

Taxa de germinação calculada com base no número de colônias observadas em placa, tendo o controle do experimento usado como referência. -: sem germinação.



Continua...

Continuação:



Continua...

Continuação:

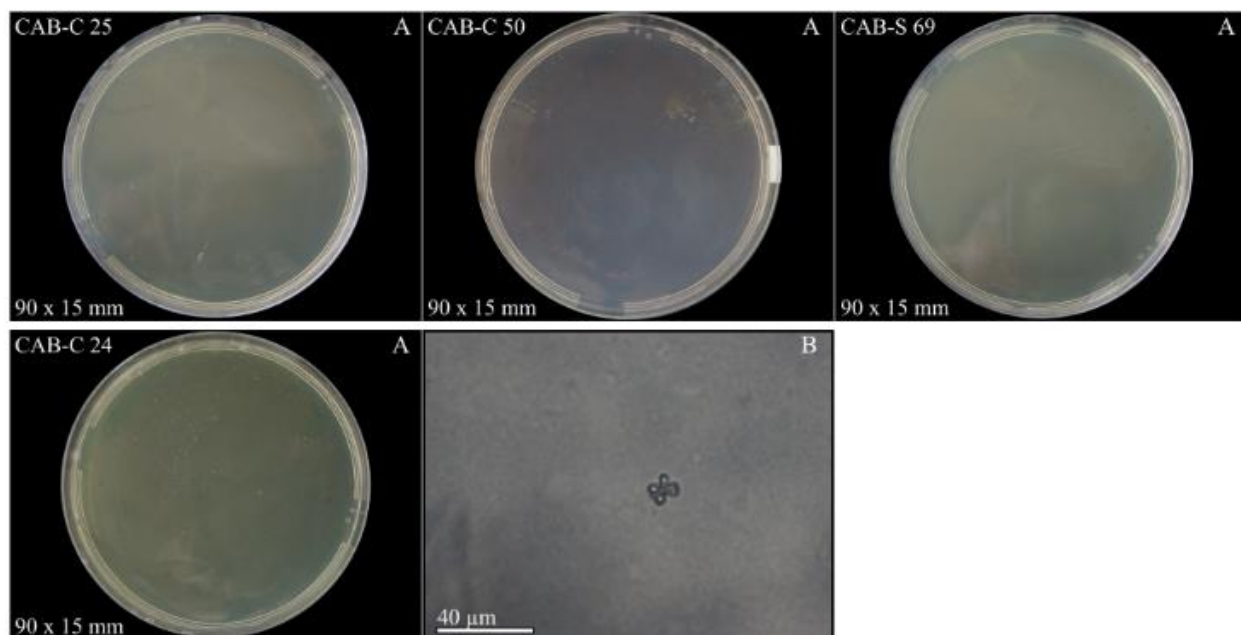


Figura 4: Avaliação do efeito de substâncias produzidas por diferentes isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces* sp. na morfologia das colônias e na germinação dos conídios de *Foc* após sete dias de cultivo a 25 °C sobre o meio de cultura. A: Isolado cultivado em placa de Petri plástica 90 x 15 mm. B: Aspecto do micélio e das colônias de *Foc* observado por microscópio estereoscópio lupa (Olympus SZ61); C: Aspecto das hifas e micélio sob efeito dos metabólitos observado por microscópio invertido (Olympus IX70).

3.1.3. Teste com o extrato bruto

Os extratos brutos liofilizados dos 12 isolados apresentaram variação em relação à atividade contra os três diferentes microrganismos testados e também ao rendimento por biomassa (Tabela 4, Fig. 5). Os extratos dos isolados CAB-C 24, CAB-C 25, CAB-S 69 e do CAB-S 70 mostraram uma expressiva atividade inibitória contra *S. aureus*; o extrato obtido a partir do crescimento de CAB-S 67 apresentou atividade inibitória, embora menor em relação aos demais e ao controle positivo usado (ampicilina). Contra a bactéria Gram negativa APP, houve atividade inibitória nos extratos dos isolados CAB-C 24, CAB-S 66, CAB-S 67, CAB-S 69, CAB-S 70, CAB-S 72 e CAB-S 96, sendo a zona de inibição do extrato do isolado CAB-S 67 a maior observada. O extrato de apenas um isolado, o isolado CAB-C 50, mostrou atividade contra a levedura *C. albicans* (Tabela 4, Fig. 5).

Tabela 4: Resultado do teste de difusão em disco de papel do extrato bruto das diferentes actinobactérias contra *Candida albicans*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. A inibição é representada pelo diâmetro da zona de inibição (mm).

Isolados	Biomassa microbiana (g)	Rendimento extrato bruto (g)	Zona de Inibição (mm)		
			<i>C. albicans</i>	APP	<i>S. aureus</i>
CAB-C 12	0.651	1.77	-	-	-
CAB-C 21	1.016	1.49	-	-	-
CAB-C 24	0.613	2.83	-	7.82	22.23
CAB-C 25	0.695	1.74	-	-	23.91
CAB-C 50	0.793	1.46	13.47	-	-
CAB-S 66	1.320	1.60	-	14.43	-
CAB-S 67	1.454	0.93	-	18.16	15.89
CAB-S 69	1.000	1.44	-	13.19	25.94
CAB-S 70	0.778	1.77	-	-	22.60
CAB-S 71	1.453	1.69	-	13.53	-
CAB-S 72	1.214	1.20	-	10.18	-
CAB-S 96	1.004	1.03	-	10.09	-
Nistatina	NA	NA	30.43	-	NA
Tetraciclina	NA	NA	NA	34.26	NA
Ampicilina	NA	NA	NA	-	27.99

APP = *Actinobacillus pleuropneumoniae*; - = Atividade não detectada; Nistatina (30 µg) controle positivo para *C. albicans*; Tetraciclina (30 µg), controle positivo para APP; Ampicilina (10 µg), controle positivo para *S. aureus*. NA: não se aplica.

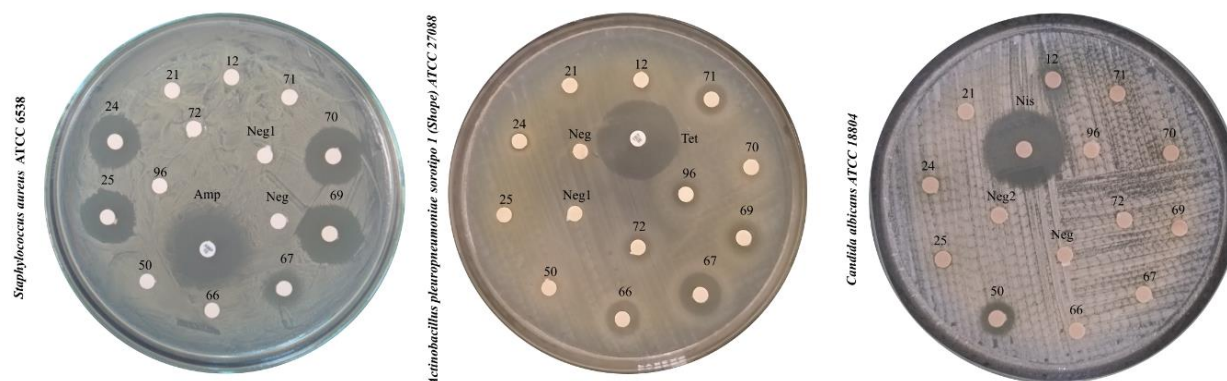


Figura 5: Teste de disco-difusão utilizando extratos brutos obtidos a partir do crescimento de 12 diferentes isolados de actinobactérias previamente selecionados. A: *S. aureus* após 24 horas de incubação a 37 °C em meio Mueller-Hilton ágar; B: *A. pleuropneumoniae* após 24 de incubação a 37 °C em meio BHI/ NAD; C: *C. albicans*, após 24 de incubação a 37 °C em meio Ágar Dextrose Saboraund. Os números acima dos discos representam a identificação dos isolados produtores dos extratos testados. Os discos apresentam diâmetro de 6 mm na concentração de 2 mg de extrato por disco. Isolados testados: CAB-C 12 CAB-C 21, CAB-C 24, CAB-C 25, CAB-C 50; CAB-S 66, CAB-S 67, CAB-S 69, CAB-S 70, CAB-S 71, CAB-S 72, CAB-S 96; controles positivos: Nis: nistatina (30 µg), Tet: tetraciclina (30 µg), Amp: ampicilina (10 µg); controles negativos: Neg: disco sem extrato; Neg1: solução salina (NaCl - 0,85%); Neg2: água destilada esterilizada.

4. Discussão

A rizosfera, região do solo que circunda as raízes das plantas, é considerada uma das interfaces mais dinâmicas da terra (Philippot et al., 2013), sendo influenciada por diversos fatores (Lange et al., 2015; Steinauer et al. 2016). Nesse ambiente, assim como em composto orgânico, oriundo da compostagem de resíduos agropecuários, o filo Actinobacteria é um dos mais abundantes (Yu et al., 2007; Bulgarelli et al., 2013; Zhang et al., 2014; Yuan et al., 2015; Xue et al., 2015; Ren et al., 2016; Xun et al., 2016; Cai et al., 2017; Yadav et al., 2017; Philippot et al., 2013). Bactérias do gênero *Streptomyces* são comumente o grupo mais abundante no solo dentre as actinobactérias, mantendo-se em estado latente em solo com baixa disponibilidade de nutrientes pela produção de esporos (Xu et al., 1996; Barka et al., 2016; Kemung et al., 2018). A dominância desse gênero no isolamento a partir de amostras de solo e compostagem foi relatada em diversos trabalhos (Cuesta et al., 2012; Zhao et al., 2012; Suárez-Estrella et al., 2013; Větrovský et al., 2014; Elbendary et al., 2018).

O gênero *Pseudonocardia*, pertencente à família Pseudonocardiaceae, compreende bactérias filamentosas, são encontradas em diferentes ambientes, tais como solo, material vegetal, esterco, compostagem, amostras clínicas e veterinárias, apresentando isolados relatados como produtores de moléculas ativas de interesse farmacêutico, embora ainda pouco explorados (Ludwing et al., 2012; Mangamuri et al., 2016). Alguns isolados deste gênero associam-se a formigas *Attini* sp. (popularmente conhecidas como formigas cortadeiras) em jardins, atuando no controle de fungos patogênicos a tais formigas, pela produção de antibióticos (Sen et al., 2009; Poulsen et al., 2010).

Por outro lado, as bactérias do gênero *Micrococcus* são esféricas e não produtoras de filamentos (Ludwing et al., 2012). Encontram-se vastamente disseminadas na natureza, sendo encontradas em diferentes habitats, como associadas ao corpo humano, em ambiente marinho, poeira do ar, solo, pele e secreções de animais (Dib et al., 2013; Britannica Academic, 2018). Algumas bactérias deste gênero foram descritas como produtoras de moléculas ativas com aplicações biotecnológicas, pela produção de enzimas, como glutaminas (Yano et al. 2006; Yoshimune et al. 2006), esterases (Maruyama et al. 2005), proteases (Manikandan et al. 2011) e amilase (Fan et al. 2009), além da sua atuação no amadurecimento e qualidades organolépticas de queijos (Addis et al. 2001; Prado et al. 2001), embora não sendo encontrados relatos de isolados deste gênero com atuação no controle de patógenos.

O Gênero *Brevibacterium*, pertencente à família Brevibacteriaceae, apresenta bactérias não ramificadas, encontradas em variados ambientes, sendo comuns em ambiente com alta concentração salina, como em águas marinhas, sendo encontradas também associados a queijo, em amostras de solo e compostagem de lodo de esgoto (Gruner et al., 1993; Ohnishi et al., 2011; Ludwig et al., 2012), com alguns isolados descritos atuando na redução do estresse em plantas, por produzirem a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase (Chatterjee, et al., 2018), e na degradação de queratina de resíduos de pelos de animais (Thankaswamy et al., 2018).

O filo Actinobacteria que, a princípio, era constituído por bactérias cuja a característica principal era a formação de micélio, sendo chamadas de actinomicetos (Chandra & Chater, 2013). Atualmente, com o desenvolvimento e uso de novas técnicas de classificação, bactérias que originalmente não formavam micélios foram incluídas no filo Actinobacteria (Zhi et al., 2009). Embora haja uma considerável diversidade de microrganismos em solo rizosférico e composto orgânico, por limitação da técnica dependente de cultivo (Lewis et al., 2010; Zhao et al., 2012), há uma baixa diversidade de gêneros isolados, embora análise da diversidade dependente de cultivo não tenha sido o objetivo deste estudo. Além disso, o meio CA, proposto nesse trabalho, foi o que possibilitou o isolamento de maior número de isolados de gêneros diferentes, seguido pelo HVA, o qual é descrito na literatura como o meio que permite o isolamento de diferentes gêneros deste filo, embora neste trabalho tenha sido modificado (Hayakawa & Nonomura, 1987; Kaewkla & Franco, 2013; Kampapongsa & Kaewkla, 2015).

A maioria dos *clados* formados observada pela análise bayesiana é corroborada pelo trabalho de Labeda et al. (2012). O gênero *Kitasatospora* é classificado junto com os gêneros *Streptacidiphilus* e *Streptomyces* na família Streptomycetaceae (Ludwing et al., 2012), embora os dois primeiros gêneros supracitados formem *clados* separados em árvores a partir de análise de sequências do DNAr 16S, muitas espécies apresentam sequências com alta semelhança com espécies do gênero *Streptomyces*, assim em alguns casos, sendo considerado gênero “*incertae sedis*” como no Manual de Bergey’ (Ludwing et al., 2012), assim, provavelmente são isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces*. A distinção de espécies dos gêneros *Kitasatospora* e *Streptomyces* é consideravelmente difícil de realizar com base apenas em características fenotípicas e, na maioria das vezes, molecular, sendo necessário análises de componentes de parede celular, por exemplo (Ludwing et al., 2012; Girard et al., 2014) e, assim como bactérias do

gênero *Streptomyces*, as bactérias do gênero *Kitasatospora* são comumente encontradas no solo, são formadoras de micélio, com cadeias longas de hifas e esporos, embora sem relatos na aplicação no controle de microrganismos patogênicos até então (Li et al., 2009; Ludwing et al., 2012; Girard et al., 2014).

A definição de espécies para isolados pertencentes ao filo Actinobacteria, principalmente para o gênero *Streptomyces*, é limitada muitas vezes por escassez de características fenotípicas (Labeda et al., 2012), o que implica na denominação de diferentes espécies disponíveis em banco de dados para um mesmo isolado na maioria dos casos, fazendo necessário de uma abordagem filogenética mais abrangente, como por exemplo, o uso de vários genes ou do genoma completo dos isolados estudados para uma classificação mais precisa. Mesmo alguns isolados deste trabalho estando bem relacionados a alguma espécie, não é possível a atribuição taxonômica, devido a baixa resolução da região utilizada para a comparação filogenética e atribuição taxonômica, a qual corresponde à região do rDNA e o tamanho da região sequenciada, e posteriormente alinhada, ser correspondente a apenas ~640 pares de bases.

A variação observada nos resultados dos testes contra os fungos filamentos, pareamento de culturas e germinação de conídeos pelo teste do papel celofane, tanto no percentual de inibição quanto na germinação de conídeos e no desenvolvimento das colônias, é reflexo da versatilidade metabólica dos diferentes isolados (Hamedi et al., 2015; Azarakhsh et al., 2017; Betancur et al., 2017; Aparicio et al., 2018; Kumar et al., 2018). A alteração observada no desenvolvimento das colônias no teste de germinação de conídeos pode estar relacionada com a concentração da(s) molécula(s) ativas no extrato bruto produzidos pelos isolados nas condições do experimento, uma vez que são isolados diferentes, podem produzir diferentes metabólitos e em diferentes taxas, como corroborado pelo teste de cultura pareada, onde houve diferentes taxas de inibição em um mesmo período de avaliação. Trabalho similar foi realizado por Getha & Vikineswary (2002) em que eles observaram a presença de tubos germinativos distorcidos e inibição pós germinação dos esporos de *Foc* por efeito do extrato bruto da bactéria *Streptomyces violaceusniger* (isolado G10).

A variação na razão entre produção do extrato bruto e biomassa bacteriana entre os isolados é reflexo da fisiologia de cada um destes microrganismos, e as moléculas com atividade antimicrobiana contra os diferentes microrganismos testados pode estar em diferentes concentrações no extrato bruto, o que pode refletir diretamente na atividade frente aos microrganismos testes avaliados, fatores estes que podem ser otimizados futuramente. Alguns dos

isolados testados apresentaram amplo espectro de ação, com moléculas ativas contra fungos filamentosos e leveduriforme, como o isolado CAB-C 50; outros com atividade somente contra fungos filamentosos e bactérias (Gram positiva e Gram negativa), como os isolados CAB-C 24, CB-S 67 e CAB-S 69; atividade contra fungos filamentosos e bactéria Gram negativa, o CAB-S 66, CAB-S 71, CAB-S 72 e CAB-S 96; e atividade contra fungo filamentosos e bactéria Gram positiva, os isolados CAB-C 25 e CAB-S 70. Actinobactérias produzem uma vasta gama de metabólitos, com diferentes aplicações (Hamedi et al., 2015, Kemung et al., 2018) e o gênero *Streptomyces* é o mais estudado e relatado como maior produtor de compostos com aplicações biotecnológicas (Gao & Gupta, 2012; Abdelmohsen et al., 2015.). Seu extenso conteúdo genético, sendo encontrado até 12 Mpb em *Streptomyces bingchengensis* (Gao & Gupta, 2012) abriga *cluster* de genes relacionados a diferentes vias de biossíntese, com amplo espectro de atividades biológicas, sendo relatado que cada genoma de *Streptomyces* produtora de metabólitos secundários, possui em seu genoma cerca de 20 *loci* potenciais para biossíntese de metabólitos secundários (Hamedi et al., 2015; Azarakhsh et al., 2017; Betancur et al., 2017; Aparicio et al., 2018; Kumar et al., 2018).

A capacidade de 10 isolados inibirem diferentes microrganismos é resultado do potencial de uma única actinobactéria ser capaz de produzir vários metabólitos, dos quais podem pertencer à diferentes classes, com vasto espectro de atuação, como observado no trabalho de Aouiche et al. (2014). O primeiro antibiótico produzido a partir de actinobactérias foi a estreptomicina no ano de 1940, pela produção de um composto natural produzido pela bactéria *Streptomyces griseus*, isolado do solo (Ludwing et al., 2012; Woodruff, 2014). A partir de então, vários trabalhos têm sido realizados com bactérias deste filo, principalmente do gênero *Streptomyces*, em busca de diferentes compostos bioativos e de uma gama de enzimas com potencial para atuarem no controle de microrganismos patogênicos (Das et al., 2015; Shivilata & Satyanarayana, 2015). O fato de ser um gênero amplamente distribuído, fortalece a ideia de que são bactérias altamente competitivas, o que está associado ao seu aparato molecular e ao seu potencial metabólico que as tornam ótimas competidoras frente às comunidades microbianas no ambiente em que se encontram (Shivilata & Satyanarayana, 2015; Kemung et al., 2018) sendo ótimas candidatas para o controle biológico de microrganismos patogênicos.

5. Conclusões

Solo rizosférico de bananeira e composto orgânico apresentam como membros da sua microbiota, actinobactérias com potencial para o biocontrole de diferentes microrganismos patogênicos. O gênero *Streptomyces* foi o mais abundante dentre os isolados identificados e o que apresentou maior número de isolados com antagonismo em relação aos microrganismos teste investigados. Alguns destes isolados produzem substâncias (podendo ser metabólitos secundários) com alto potencial para a inibição do crescimento de *Foc*, bem como com amplo espectro de ação, por inibirem fungos filamentosos e levedura, além de bactérias Gram positiva e negativa de importância médica (humana e animal). Estudos visando a identificação das substâncias ativas produzidas pelas actinobactérias identificadas e testes *in vivo* serão realizados posteriormente para melhor elucidar o(s) mecanismo(s) de ação destas actinobactérias no controle de microrganismos patogênicos.

6. Referências

- Abdelmohsen, U., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M., Quinn, R., Hentschel, U., 2015. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances* 33, 798–811.
- Addis, E., Fleet, G., Cox, J., Kolak, D., Leung, T., 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *Int J Food Microbiol* 69, 25–36.
- Alekhyia, G., Gopalakrishnan, S., 2017. Biological Control and Plant Growth-Promotion Traits of *Streptomyces* Species Under Greenhouse and Field Conditions in Chickpea. *Agr Res* 6, 410–420.
- Alvarez, A., Saez, J. M., Costa, J. S. D., Colin, V., L., Fuentes, M., S., Cuzzo, S., A., Benimeli, C., S., Polti, M., A., Amoroso, M., J., 2017. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere* 166, 41–62.
- Aouiche, Bijani, Zitouni, Mathieu, Sabaou, 2014. Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces* spp. PAL114 isolated from a Saharan soil. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* 24, e17–e23.
- Aparicio, J., Raimondo, E., Gil, R., Benimeli, C., Polti, M., 2018a. Actinobacteria consortium as an efficient biotechnological tool for mixed polluted soil reclamation: Experimental factorial design for bioremediation process optimization. *J Hazard Mater* 342, 408–417.
- Aparicio, J., Saez, J., Raimondo, E., Benimeli, C., Polti, M., 2018. Comparative study of single and mixed cultures of actinobacteria for the bioremediation of co-contaminated matrices. *J Environ Chem Eng* 6.
- Arocha-Garza, H., Castillo, R., Eguiarte, L., Souza, V., Torre-Zavala, S., 2017. High diversity and suggested endemicity of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis. *PeerJ* 5, e3247.

- Azarakhsh, Y., Mohammadipanah, F., Nassiri, S.M., Siavashi, V., Hamed, J., 2017. Isolation and screening of proangiogenic and antiangiogenic metabolites producing rare actinobacteria from soil. *J Appl Microbiol* 122, 1595–1602.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S., 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Analysis* 6, 71–79.
- Barka, E., A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H., Clément, C., Ouhdouch, Y., Wezel, G., P., V., 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80 (1), 1-43.
- Bentancur, L., A., Naranjo-Gaybor, S., J., 2017. Vinchira-Villarraga, D., M., Moreno-Sarmiento, N., C., Maldonado, L., A., Suarez-Moreno, Z., R., Acosta-González, A., Padilla-Gonzalez, G., F., Puyana, M., Castellanos, L., Ramos, F., A. Marine Actinobacteria as a source of compounds for phytopathogen control: An integrative metabolic-profiling / bioactivity and taxonomical approach. *PLoS ONE* 12 (2): e0170148. doi: 10.1371/journal.pone.0170148.
- Bérdy, J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites: A personal view. *The Journal of Antibiotics* 58 (1), 1-26.
- Bérdy, J., 2012. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiotics* 65, 385.
- BORA, N., 2015. Actinobacterial Diversity and Dynamics as Revealed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. In.: Bora, N; DODD, N; DESMASURES, N. (Edit.). Springer, 103-133.
- Britannica Academica, 2019. *Micrococcus*. <https://academic-eb-britannica.ez35.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/Micrococcus/5252499> (acessado em janeiro de 2019).
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., Themaat, E., V., L., V., Schulze-Lefert, P., 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology* 64, 807–838.
- Cai, F., Pang, G., Miao, Y., Li, R., Li, R., Shen, Q., Chen, W., 2017. The nutrient preference of plants influences their rhizosphere microbiome. *Appl Soil Ecol* 110, 146–150.
- Chandra, G., Chater, K., F., 2013. Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiology Reviews* 38, 345–379.
- Chatterjee, P., Samaddar, S., Niinemets, Ü., Sa, T.-M., 2018. *Brevibacterium linens* RS16 confers salt tolerance to *Oryza sativa* genotypes by regulating antioxidant defense and H⁺ ATPase activity. *Microbiol Res* 215.
- Chean, Y., Lee, L., Chieng, C., C., Wong, V., C., M., 2015. Isolation, identification and screening of Actinobacteria in volcanic soil of Deception Island (the Antarctic) for antimicrobial metabolites. *Polish Polar Research* 36 (1), 67-78.
- Cipres, 2018. CIPRES Science Gateway. <https://www.phylo.org/portal2/home.action> (acessado em dezembro de 2018).
- Cuesta, G., García-de-la-Fuente, R., Abad, M., Fornes, F., 2012. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *J Environ Manage* 95, S280–S284.

- Das, P., Solanki, R., Khanna, M., 2015. Characterization of Extra Cellular Enzymes from Soil Actinomycetes: A Molecular Approach. *International Journal of Biotech Trends and Technology* 10 (2), 21-32.
- Dib, J., Liebl, W., Wagenknecht, M., Fariás, M., Meinhardt, F., 2013. Extrachromosomal genetic elements in *Micrococcus*. *Appl Microbiol Biot* 97, 63–75.
- Edgar, R., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792–1797.
- Elbendary, A., Hessain, A., El-Hariri, M., Seida, A., Moussa, I., Mubarak, A., Kabli, S., Hemeg, H., Jakee, J., 2018. Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. *Saudi J Biol Sci* 25, 44–46.
- Fan, H., X., Liu, Y., Liu, Z., P., 2009. Optimization of fermentation conditions for cold-adapted amylase production by *Micrococcus antarcticus* and its enzymatic properties. *Huan Jing Ke Xue* 30, 2473–2478.
- Fisher, M., Hawkins, N., Sanglard, D., Gurr, S., 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* 360, 739–742.
- Fisher, M., Hawkins, N., Sanglard, D., Gurr, S., 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* 360, 739–742.
- Gao, B., Gupta, R., S., 2012. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (1), 66 –112.
- Getha, K., Vikineswary, S., 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *J Industrial Microbiol Biotechnology* 28, 303–310.
- Girard, G., Willemsse, J., Zhu, H., Claessen, D., Bukarasam, K., Goodfellow, M., Wezel, G., 2014. Analysis of novel kitasatosporae reveals significant evolutionary changes in conserved developmental genes between *Kitasatospora* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 365–380.
- Gruner, E., Pfyffer, G., E., Graevenitz, A., V., 1993. Characterization of *Brevibacterium* spp. from clinical specimens. *American Society for Microbiology* 31 (6), 1408-1412.
- Hamed, J., Mohammadipana, F., 2015. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *J Ind Microbiol Biot* 42, 157–171.
- Hayakawa, M.; Nonomura, H., 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology* 65 (5), 501-509.
- Hollick, G., 1995 Isolation and Identification of Aerobic Actinomycetes. *Clinical Microbiology Newsletter* 17 (4), 25-32.
- Jiang, Z., Tuo, L., Huang, D., Osterman, I., Tyurin, A., Liu, S., Lukyanov, D., Sergiev, P., Dontsova, O., Korshun, V., Li, F., Sun, C., 2018. Diversity, Novelty, and Antimicrobial Activity of Endophytic Actinobacteria From Mangrove Plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Front Microbiol* 9, 868.
- Kaewkla, O., Franco, C., 2013. Rational Approaches to Improving the Isolation of Endophytic Actinobacteria from Australian Native Trees. *Microbial Ecol* 65, 384–393.

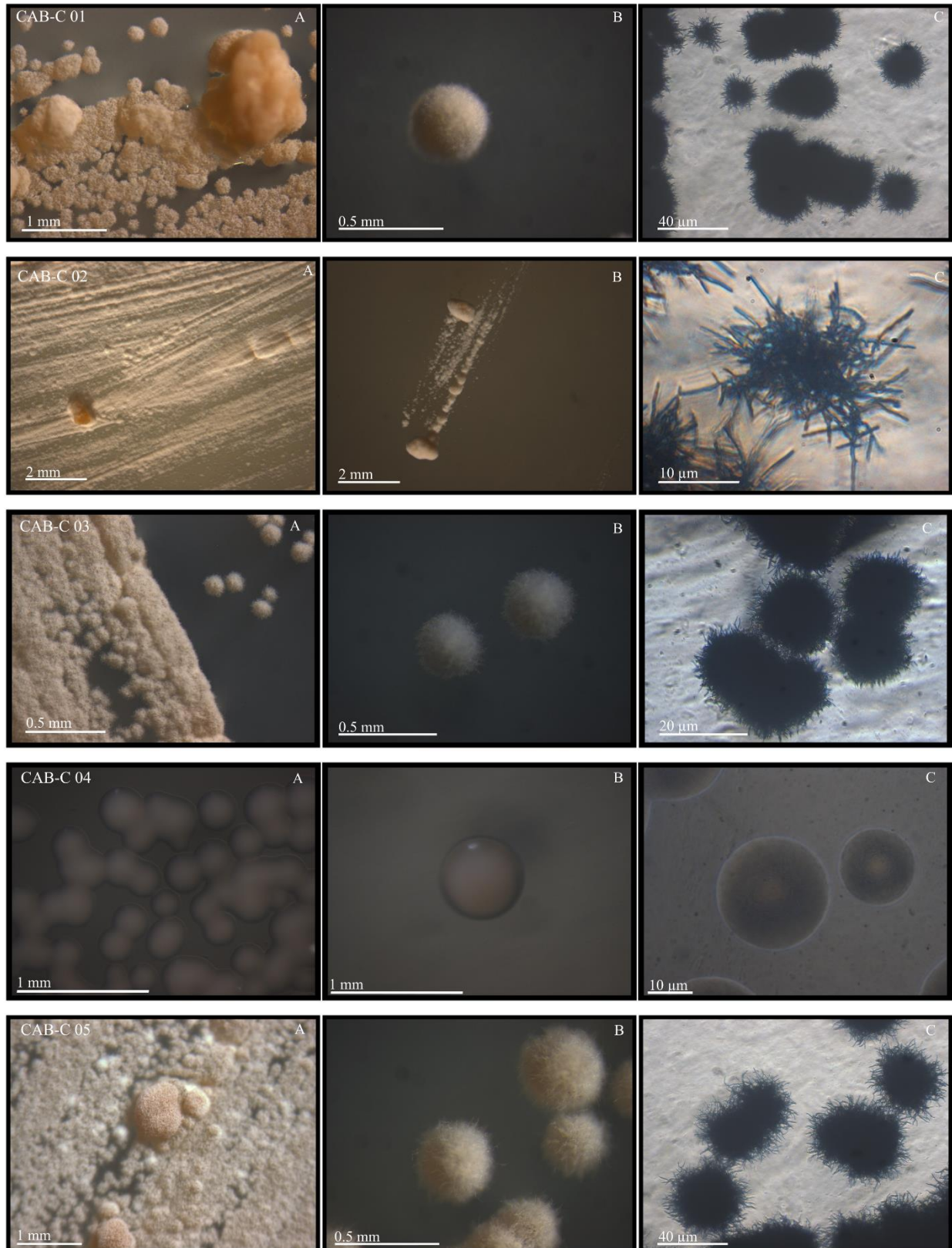
- Kampapongsa, D., Kaewkla, O., 2015. Biodiversity of endophytic actinobacteria from jasmine rice (*Oryza sativa* L. KDML 105) grown in Roi-Et Province, Thailand and their antimicrobial activity against rice pathogens. *Annals of Microbiology* 66, 587–595.
- Kang, C.-H., Kwon, Y.-J., So, J.-S., 2016. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. *Ecol Eng* 89, 64–69.
- Kemung, H., M., Tan, L., T., Khan, T., M., Chan, K., Pusparajah, P., Goh, B., Lee, L., 2018. *Streptomyces* as a Prominent Resource of Future Anti-MRSA Drugs. *Front. Microbiol.* 9, 2221.
- Labeda, D., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A., Lanoot, B., Vannanneyt, M., Swings, J., Kim, S.-B., Liu, Z., Chun, J., Tamura, T., Oguchi, A., Kikuchi, T., Kikuchi, H., Nishii, T., Tsuji, K., Yamaguchi, Y., Tase, A., Takahashi, M., Sakane, T., Suzuki, K., Hatano, K., 2012. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 73–104.
- Lange, M., Eisenhauer, N., Sierra, C., Bessler, H., Engels, C., Griffiths, R., Mellado-Vázquez, P., Malik, A., Roy, J., Scheu, S., Steinbeiss, S., Thomson, B., Trumbore, S., Gleixner, G., 2015. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nat Commun* 6, 6707.
- Lee, L.-H., Cheah, Y.-K., Sidik, S., Mutalib, N.-S., Tang, Y.-L., Lin, H.-P., Hong, K., 2012. Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for antimicrobial metabolite production. *World J Microbiol Biotechnology* 28, 2125–2137.
- Palaniyandi, S., Yang, S., Zhang, L., Suh, J.-W., 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 9621–9636.
- Lewis, K., Epstein, S., D’Onofrio, A., Ling, L., 2010. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *J Antibiotics* 63, 468.
- Li, B., Furihata, K., Kudo, T., Yokota, A., 2009. *Kitasatospora saccharophila* sp. nov. and *Kitasatospora kazusanensis* sp. nov., isolated from soil and transfer of *Streptomyces atroaurantiacus* to the genus *Kitasatospora* as *Kitasatospora atroaurantiaca* comb. nov. *J Gen Appl Microbiol* 55, 19–26.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H., Trujillo, M. E., Kampfer, P., Whitman, W. B., 2012. Road map of the phylum Actinobacteria. In: GOODFELLOW, M. et al. (Edit.). *BERGEY’S MANUAL® OF Systematic Bacteriology*. The Actinobacteria, Part A. 2^a ed. Springer 5, 01-2031.
- Mahmoud, H., Kalendar, A., 2016. Coral-Associated Actinobacteria: Diversity, Abundance, and Biotechnological Potentials. *Front Microbiol* 7, 204.
- Mangamuri, U., Muvva, V., Poda, S., Chitturi, B., Yenamandra, V., 2016. Bioactive natural products from *Pseudonocardia endophytica* VUK-10. *J Genetic Eng Biotechnology* 14.
- Manikandan, M., Kannan V., Pasic L., 2011. Extraction, purification and characterization of a protease from *Micrococcus* sp. VKMM 037. *Environmental Technology* 32, 1487–1495.
- Maruyama, K., 2005. Purification and Characterization of an Esterase Hydrolyzing Monoalkyl Phthalates from *Micrococcus* sp. YGJ1. *J Biochem* 137, 27–32.
- Miller, M., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees, 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE).

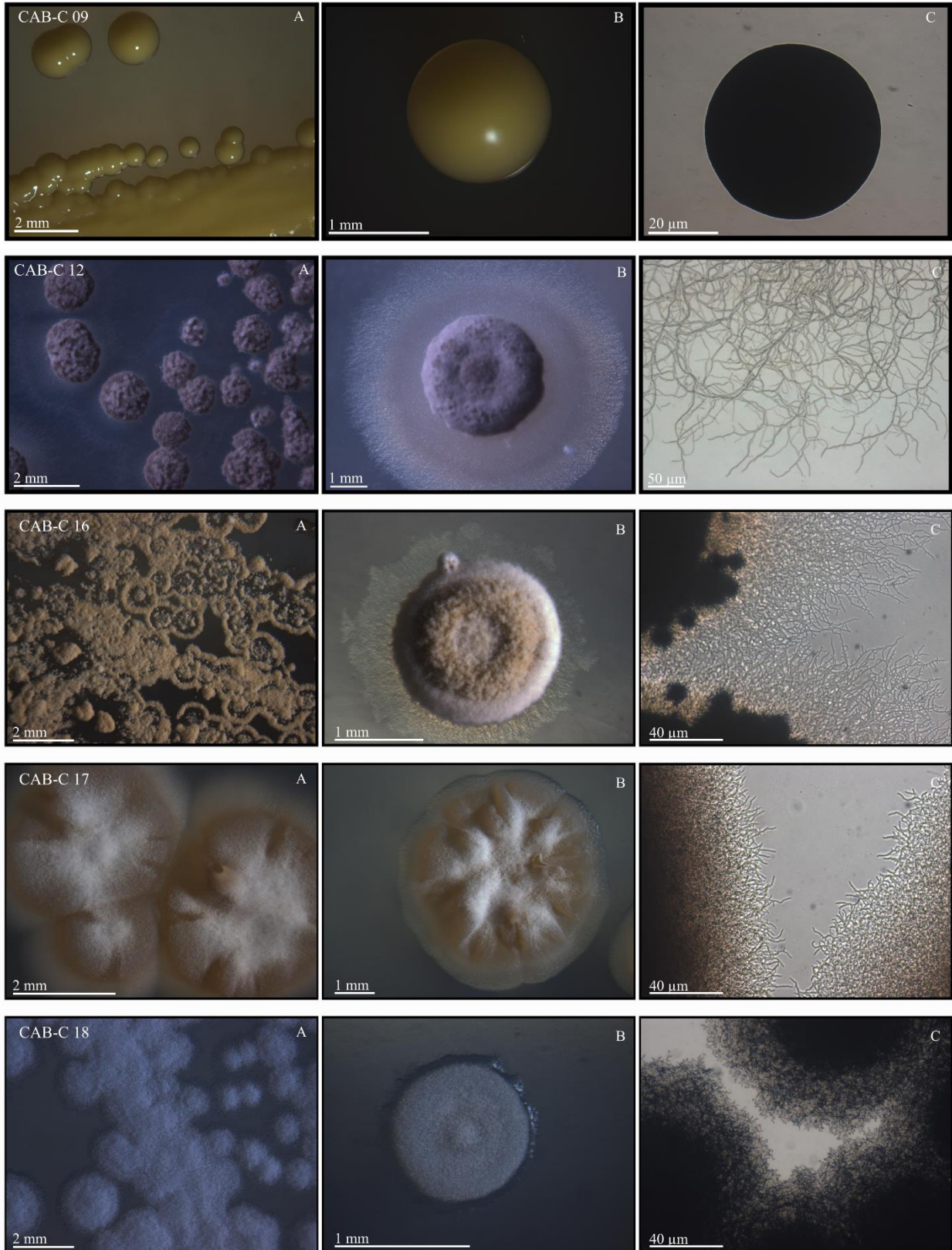
- Odumosu, B., Buraimoh, O., Okeke, C., Ogah, J., Michel, F., 2017. Antimicrobial activities of the *Streptomyces coelicolor* strain AOB KF977550 isolated from a tropical estuary. *J Taibah Univ Sci* 11, 836–841.
- Ohnishi, A., Nagano, A., Fujimoto, N., Suzuki, M., 2011. Phylogenetic and physiological characterization of mesophilic and thermophilic bacteria from a sewage sludge composting process in Sapporo, Japan. *World J Microbiol Biotechnology* 27, 333–340.
- Palaniyandi, S., Yang, S., Zhang, L., Suh, J.-W., 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 9621–9636.
- Peng, W., Li, X., Song, J., Jiang, W., Liu, Y., Fan, W., 2018. Bioremediation of cadmium- and zinc-contaminated soil using *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemosphere* 197.
- Philippot, L., Raaijmakers, J., Lemanceau, P., Putten, W., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 11, 789–799.
- Ploetz, R., 2015. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Prot* 73, 7–15.
- Poulsen, M., Cafaro, M., Erhardt, D., Little, A., Gerardo, N., Tebbets, B., Klein, B., Currie, C., 2010. Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Env Microbiol Rep* 2, 534–540.
- Prado, B., Jara, A., Moral, A., Sánchez, E., 2001. Numerical Taxonomy of Microorganisms Isolated from Goat Cheese Made in Chile. *Curr Microbiol* 43, 396–399.
- Qeshmi, F., I., Homaei, A., Fernandes, P., Javadpour, S., 2018. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. *Microbiological Research* 208, 99–112.
- Ren, G., Xu, X., Qu, J., Zhu, L., Wang, T., 2016. Evaluation of microbial population dynamics in the co-composting of cow manure and rice straw using high throughput sequencing analysis. *World J Microbiol Biotechnology* 32, 101.
- Sen, R., Ishak, H., Estrada, D., Dowd, S., Hong, E., Mueller, U., 2009. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. *Proc National Acad Sci* 106, 17805–17810.
- Shirling, E. B.; Gottlieb, D., 1966 Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16 (3), 313-340.
- Shivlata, L., Satyanarayana, T., 2015. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. *Frontiers in Microbiology* 6, 1014. doi: 10.3389/fmicb.2015.01014.
- Solano, G., Rojas-Jiménez, K., Jaspars, M., Tamayo-Castillo, G., 2009. Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96, 71–78.
- Stach, J., Maldonado, L., Ward, A., Goodfellow, M., Bull, A., 2003. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology* 5, 828–841.

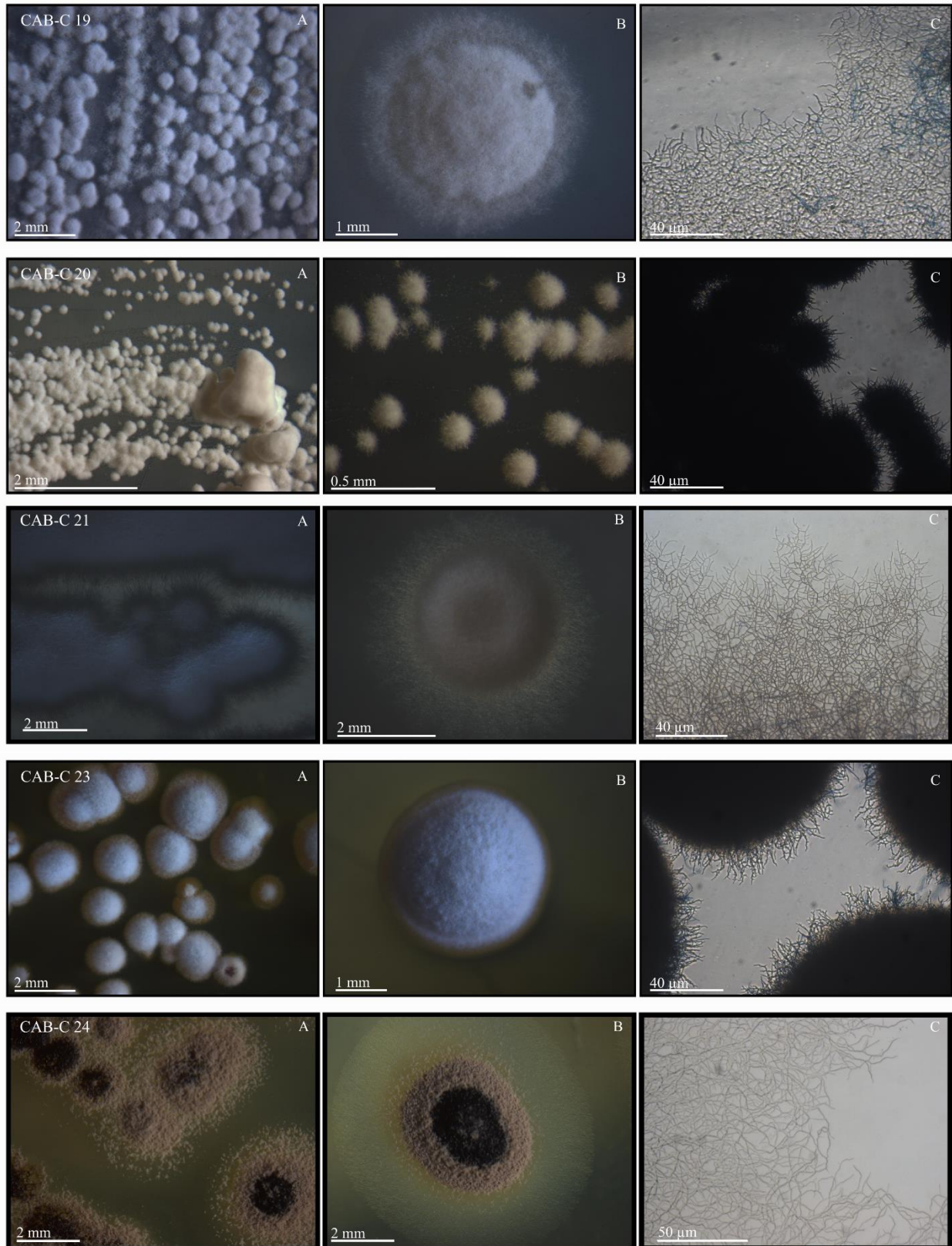
- Steinauer, K., Chatzinotas, A., Eisenhauer, N., 2016. Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? *Ecol Evol* 6, 7387–7396.
- Suárez-Estrella, F., Arcos-Nievas, M.A., López, M.J., Vargas-García, M.C., Moreno, J., 2013. Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. *Biol Control* 67, 509–515.
- Taechowisan, T., Peberdy, J., Lumyong, S., 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World J Microbiol Biotechnology* 19, 381–385.
- Thankaswamy, S., Sundaramoorthy, S., Palanivel, S., Ramudu, K., 2018. Improved Microbial Degradation of Animal Hair Waste from Leather Industry Using *Brevibacterium luteolum* (MTCC 5982). *J Clean Prod.*
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G., F., Chater, K., F., Sinderen, D., V., 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology* 71 (3), 495–548.
- Větrovský, T., Steffen, K., Baldrian, P., 2014. Potential of Cometary Transformation of Polysaccharides and Lignin in Lignocellulose by Soil Actinobacteria. *Plos One* 9, e89108.
- Wairegi, L.W.I., Asten, P.J.A., 2010. The agronomic and economic benefits of fertilizer and mulch use in highland banana systems in Uganda. *Agr Syst* 103, 543–550.
- Woodruff, H., B., 2014. Selman, A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine. *Appl. Environmental Microbiology* 80, 2–8.
- Xu, D., Han, L., Li, C., Cao, Q., Zhu, D., Barrett, N., Harmody, D., Chen, J., Zhu, H., McCarthy, P., Sun, X., Wang, G., 2018. Bioprospecting Deep-Sea Actinobacteria for Novel Anti-infective Natural Products. *Front Microbiol* 9, 787.
- Xu, L., Li, Q., Jiang, C., 1996. Diversity of Soil Actinomycetes in Yunnan, China. *Applied And Environmental Microbiology* 62 (1), 244–248.
- Xue, C., Penton, C., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., Ruan, Y., Shen, Q., 2015. Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Sci Rep-uk* 5, 11124.
- Xun, W., Zhao, J., Xue, C., Zhang, G., Ran, W., Wang, B., Shen, Q., Zhang, R., 2016. Significant alteration of soil bacterial communities and organic carbon decomposition by different long-term fertilization management conditions of extremely low-productivity arable soil in South China. *Environmental Microbiology* 18 (6), 1907–1917.
- Yadav, A., 2017. Plant Microbiomes and Its Beneficial Multifunctional Plant Growth Promoting Attributes. *Int J Environ Sci Nat Resour* 3.
- Yano, S., Kamemura, A., Yoshimune, K., Moriguchi, M., Yamamoto, S., Tachiki, T., Wakayama, M., 2006. Analysis of essential amino acid residues for catalytic activity of glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3. *J Biosci Bioeng* 102, 362–364.
- Yoshimune, K., Shirakihara, Y., Shiratori, A., Wakayama, M., Chantawannakul, P., Moriguchi, M., 2006. Crystal structure of a major fragment of the salt-tolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3. *Biochem Bioph Res Co* 346, 1118–1124.

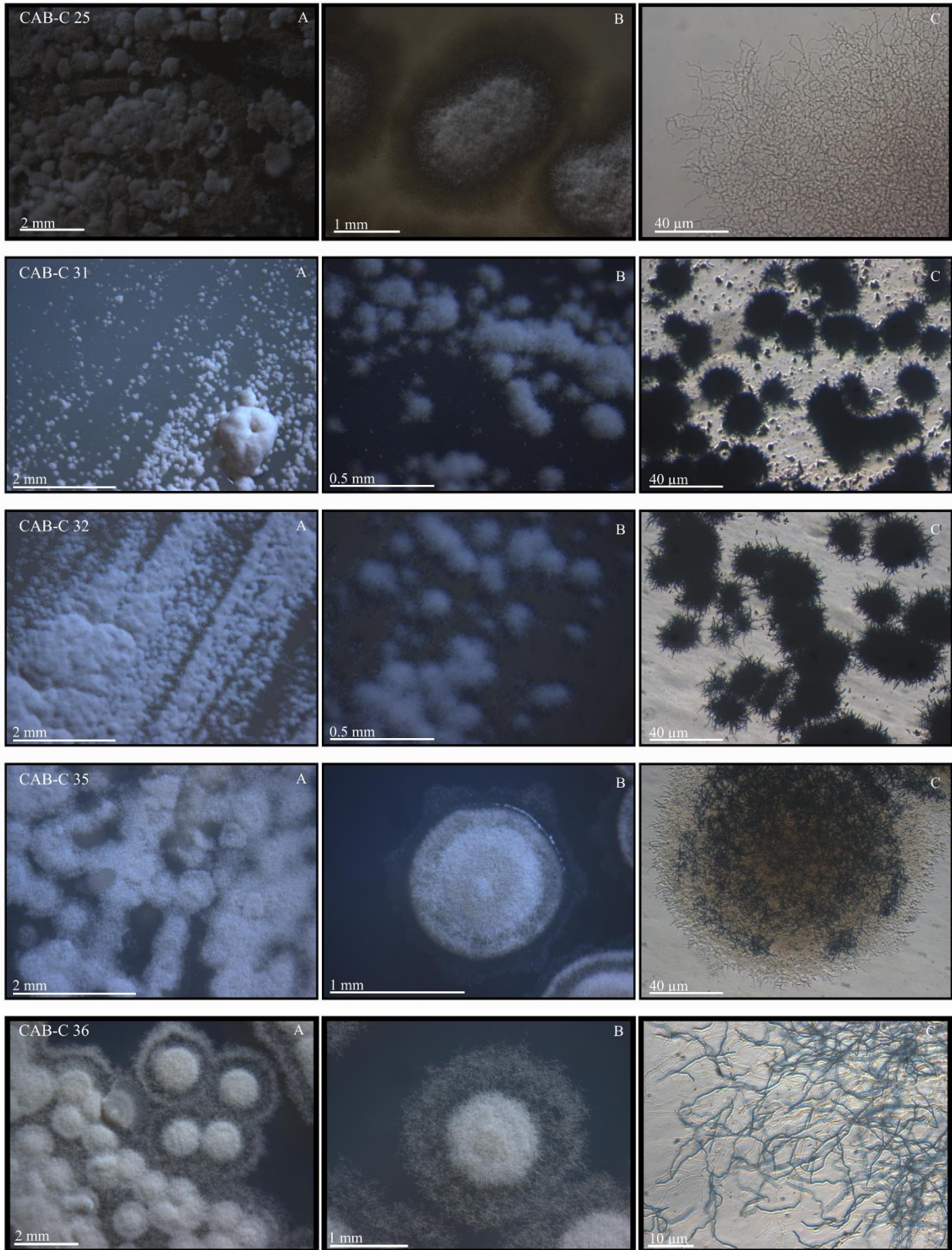
- Yu, H., Zeng, G., Huang, H., Xi, X., Wang, R., Huang, D., Huang, G., Li, J., 2007. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation* 18, 793–802.
- Yuan, J., Chaparro, J., Manter, D., Zhang, R., Vivanco, J., Shen, Q., 2015. Roots from distinct plant developmental stages are capable of rapidly selecting their own microbiome without the influence of environmental and soil edaphic factors. *Soil Biology Biochem* 89, 206–209.
- Zhang, J., Zhuang, S., Tong, C., Liu, W., 2013. Probing the Molecular Interaction of Triazole Fungicides with Human Serum Albumin by Multispectroscopic Techniques and Molecular Modeling. *J Agr Food Chem* 61, 7203–7211.
- Zhang, X., Zhong, Y., Yang, S., Zhang, W., Xu, M., Ma, A., Zhuang, G., Chen, G., Liu, W., 2014. Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production. *Bioresource Technology* 170, 183–195.
- Zhao, K., Penttinen, P., Chen, Q., Guan, T., Lindström, K., Ao, X., Zhang, L., Zhang, X., 2012. The rhizospheres of traditional medicinal plants in Panxi, China, host a diverse selection of actinobacteria with antimicrobial properties. *Appl Microbiol Biot* 94, 1321–1335.
- Zhao, Y., Lu, Q., Wei, Y., Cui, H., Zhang, X., Wang, X., Shan, S., Wei, Z., 2016. Effect of actinobacteria agent inoculation methods on cellulose degradation during composting based on redundancy analysis. *Bioresource Technology* 219, 196–203.
- Zhi, X., Li, w., Stackebrandt, E., 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 589–608.

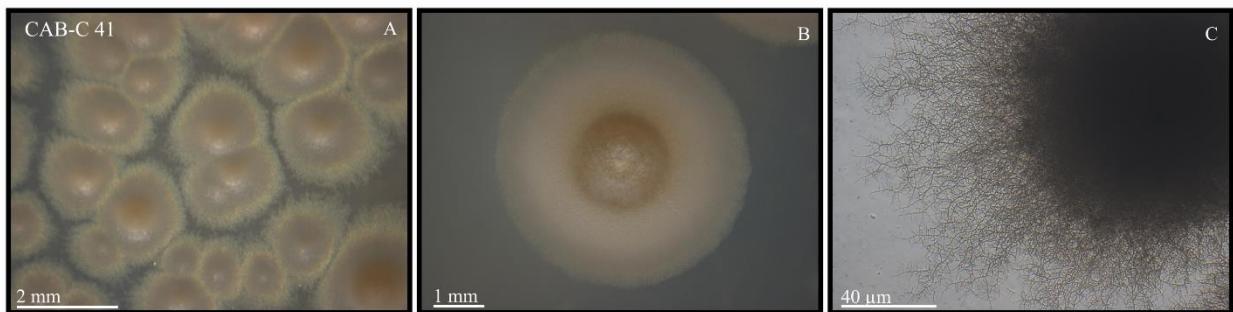
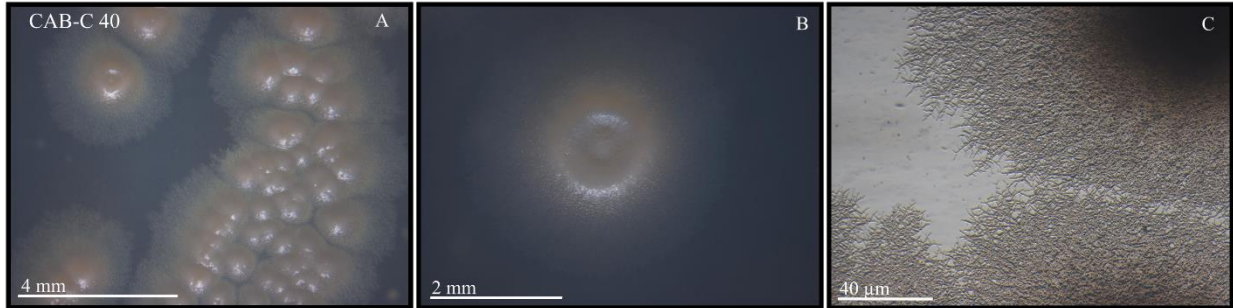
7. Apêndices

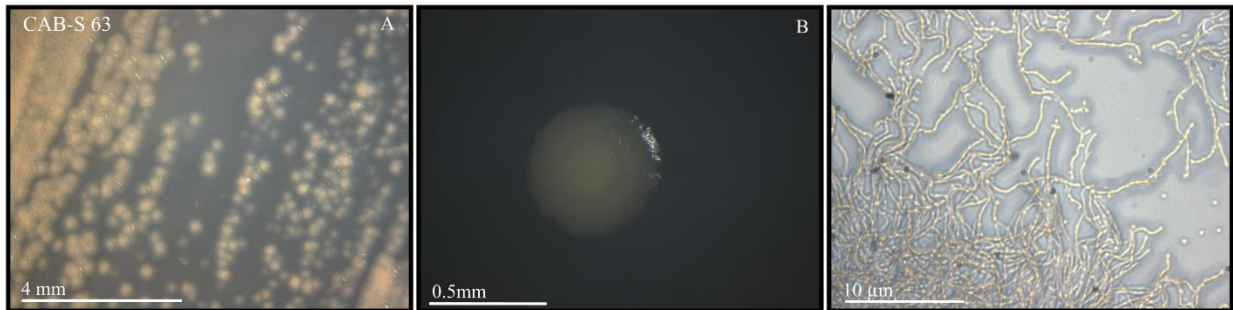
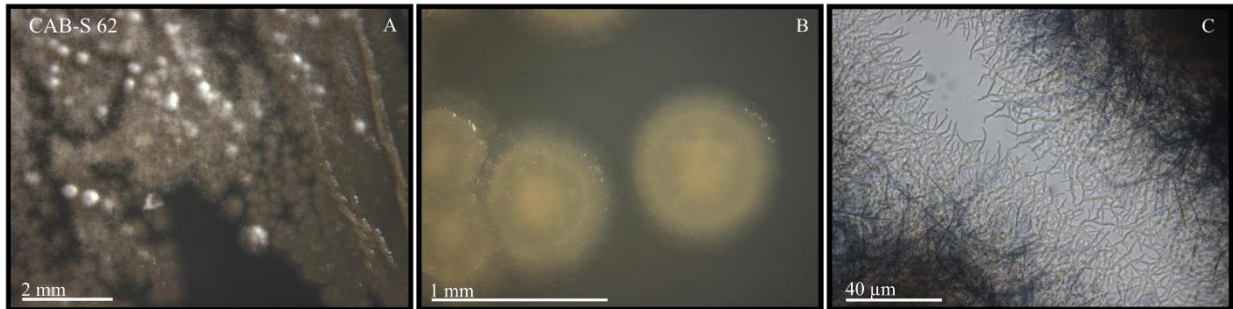
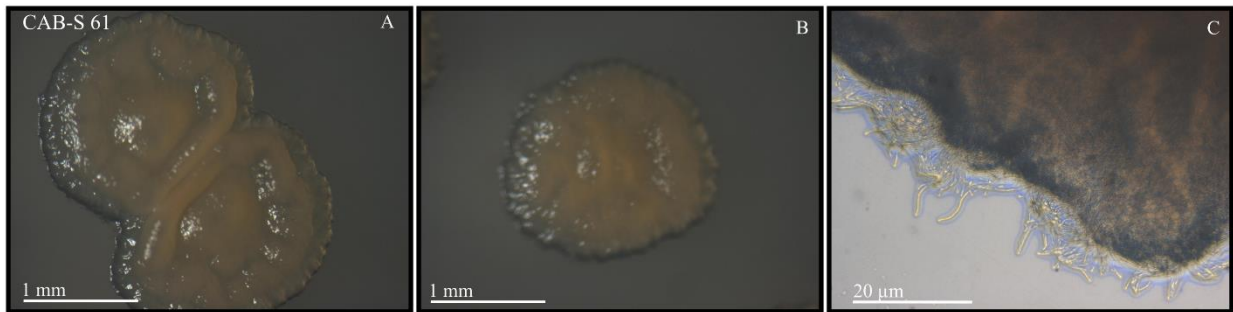
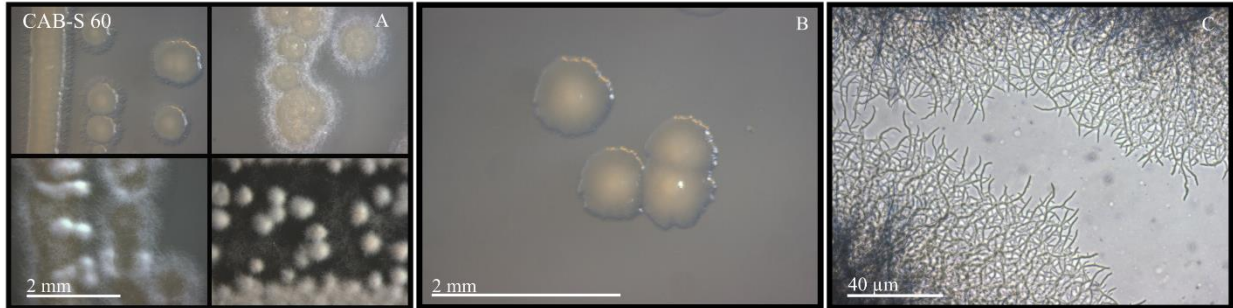
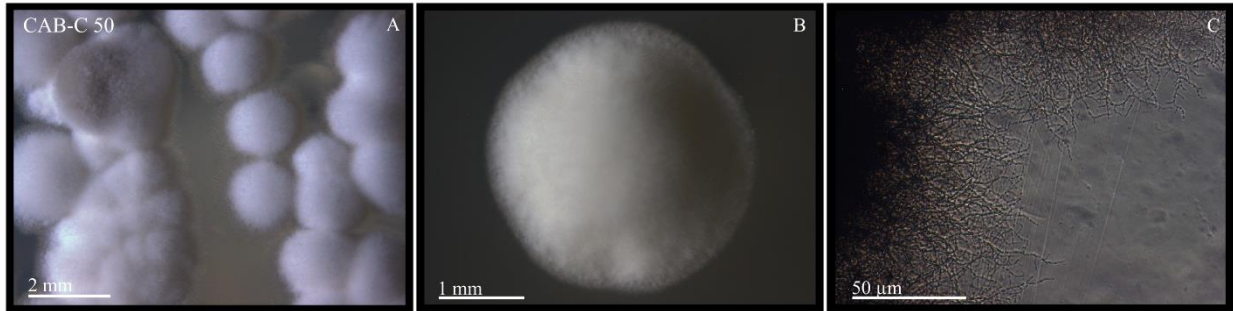


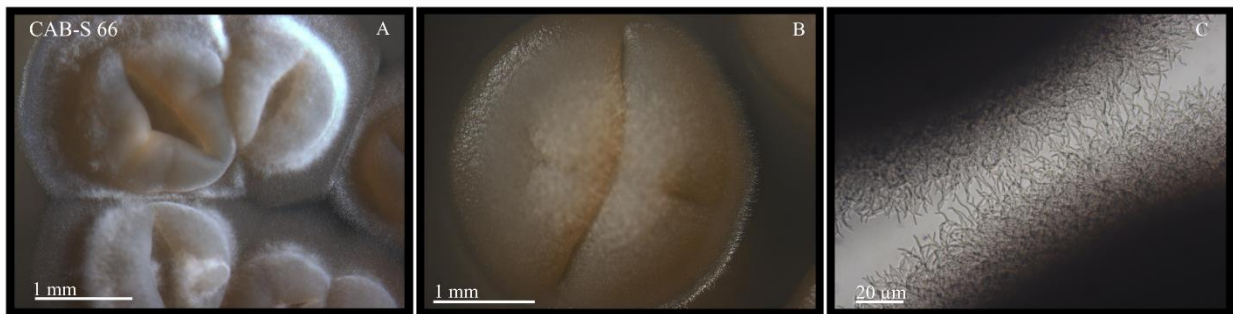
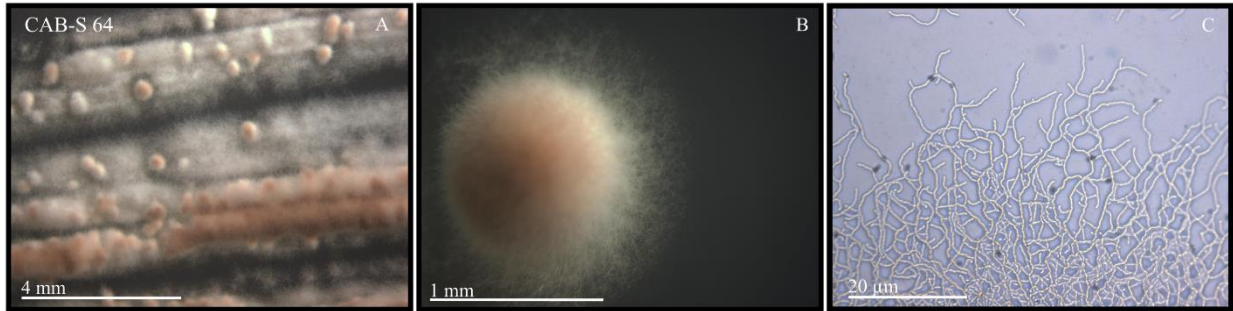




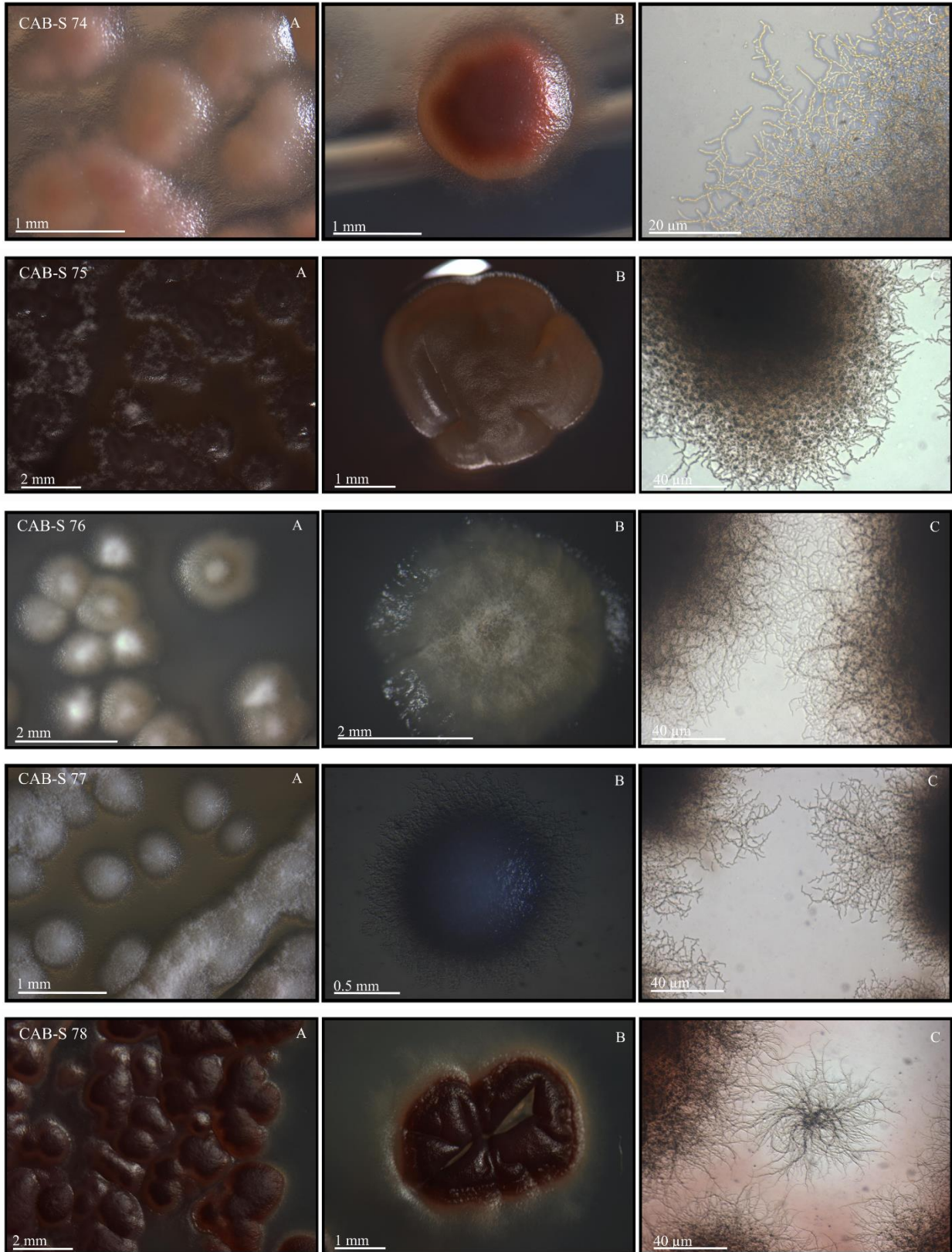


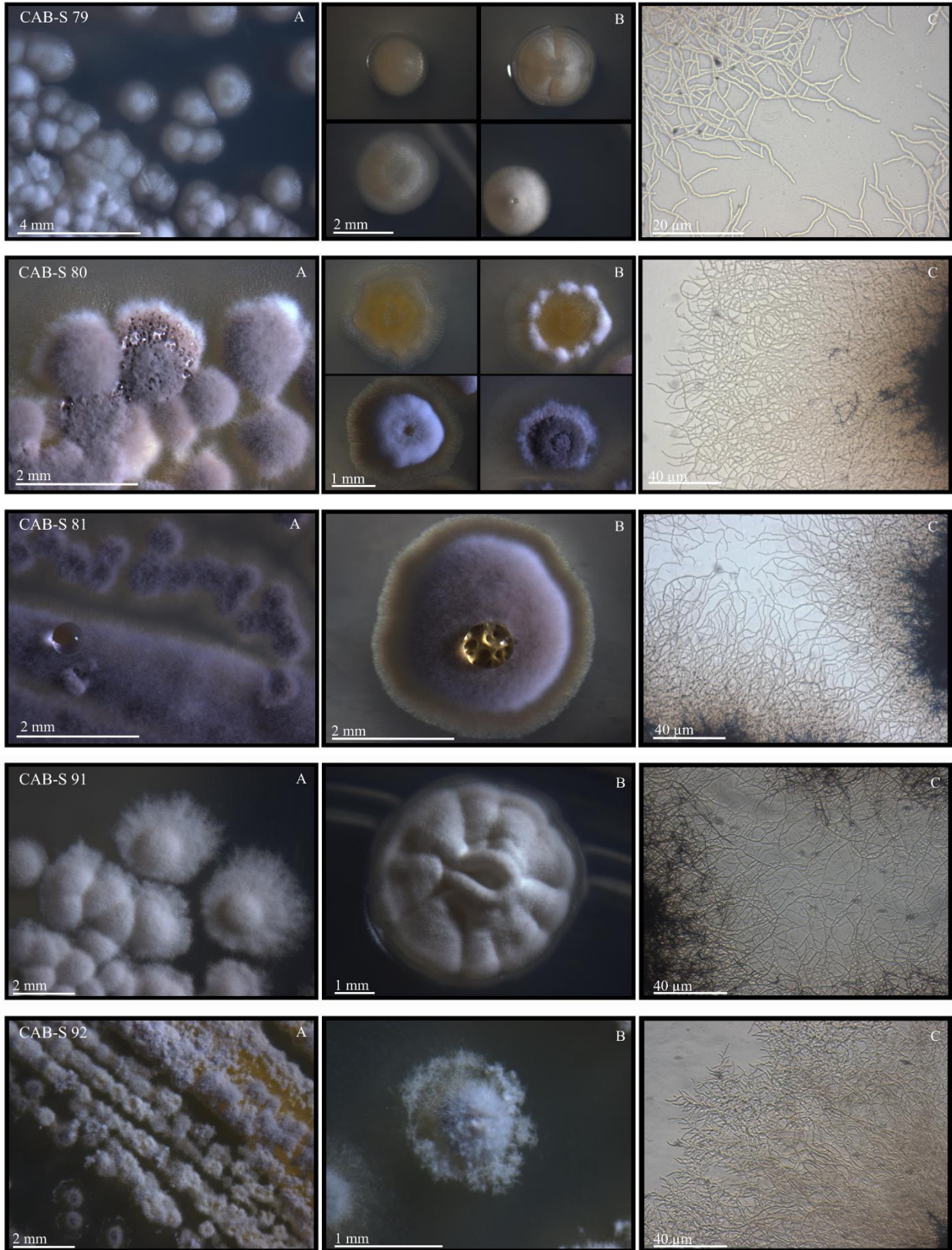


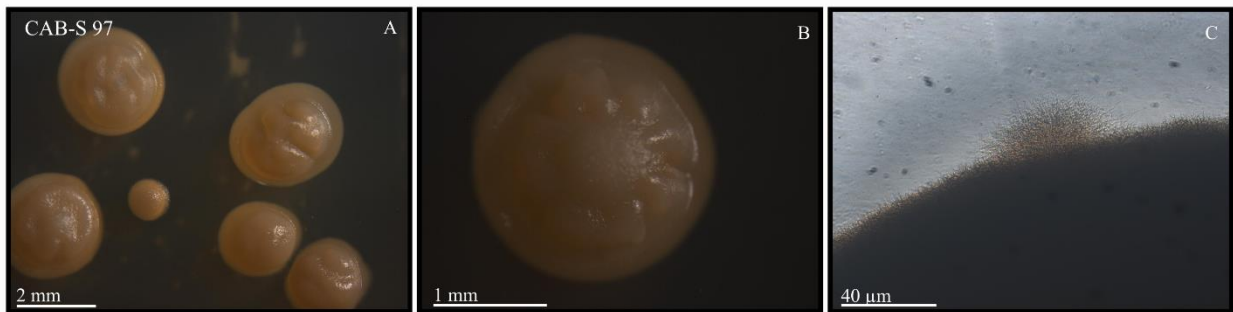
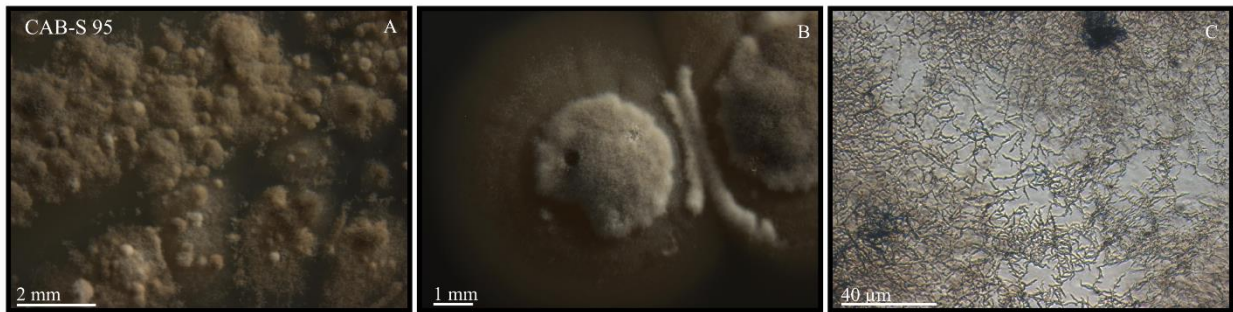
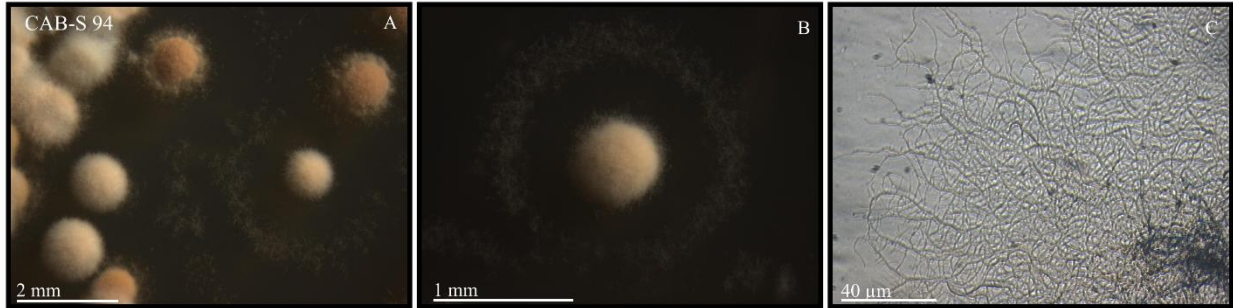
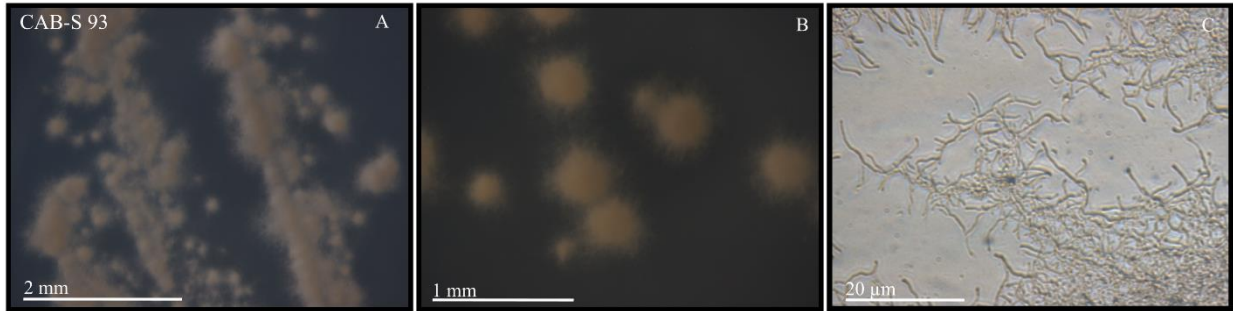


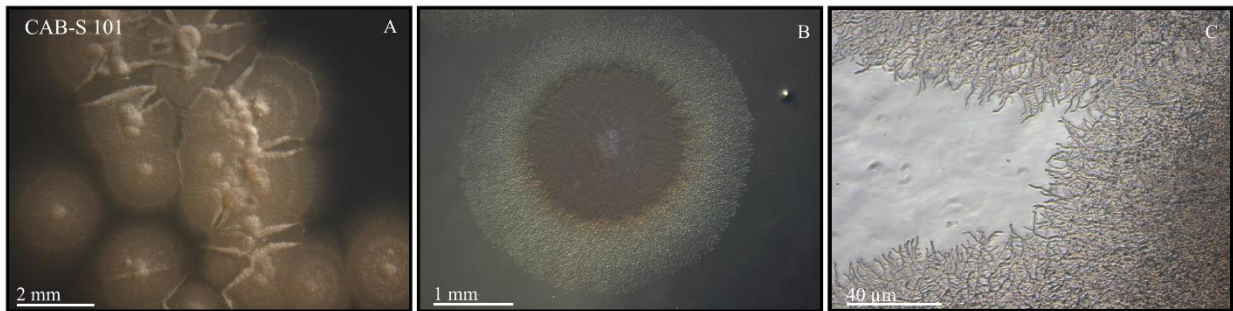
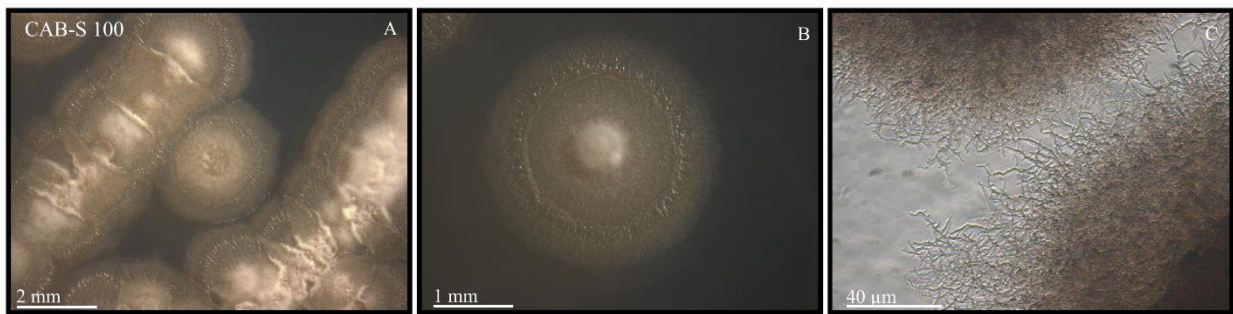
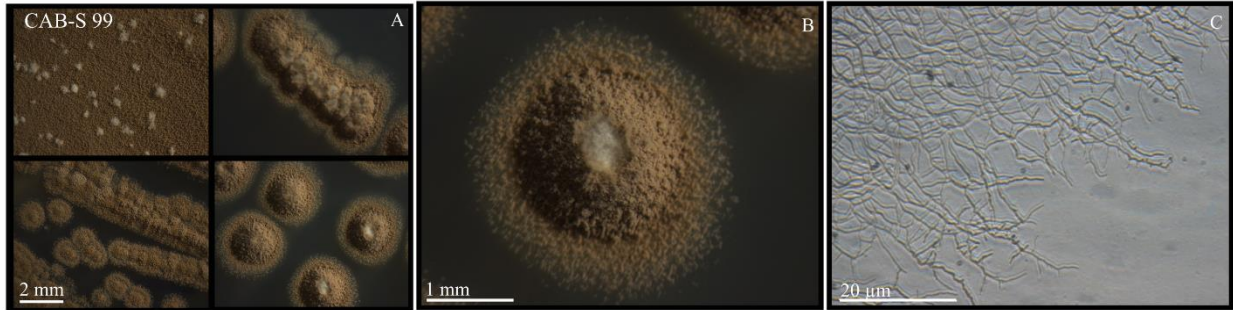


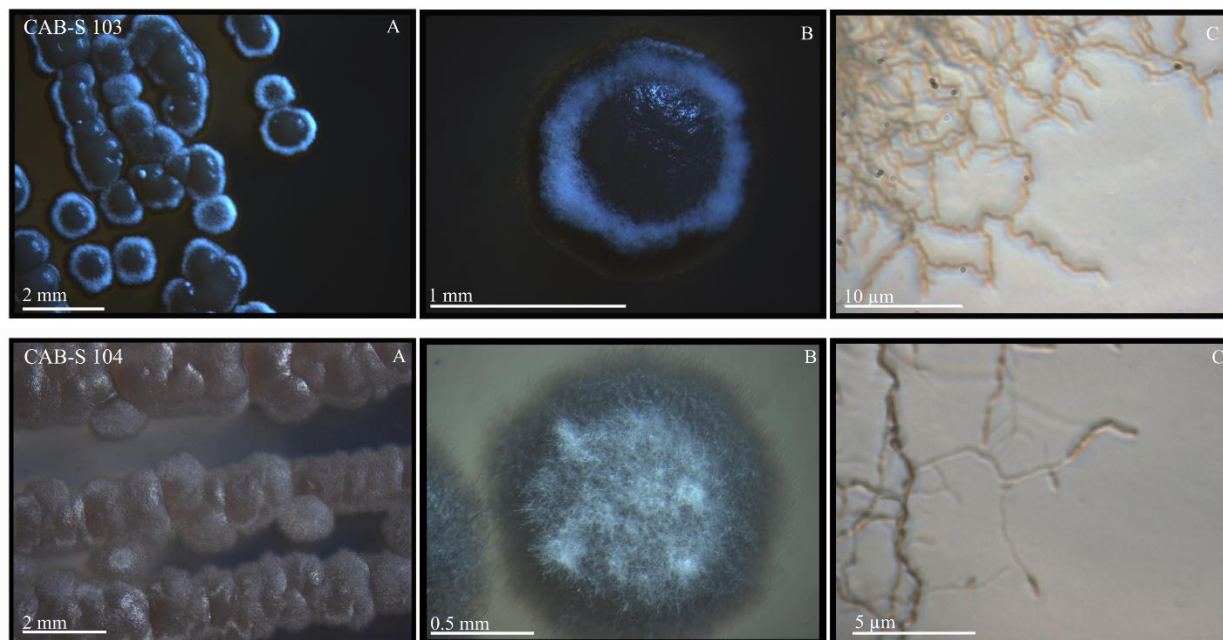




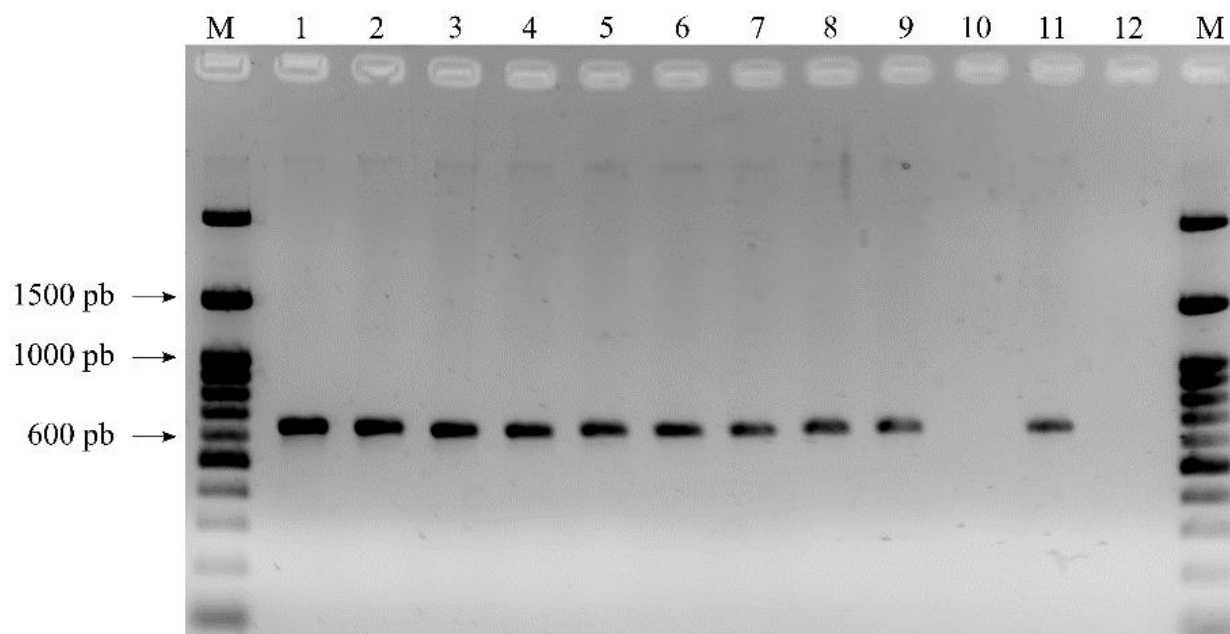








Apêndice A - Caracterização morfológica de todos os isolados obtidos no trabalho do capítulo, com identificação confirmada pelo sequenciamento do DNAr 16S. A: Aspecto cultural do isolado em maior aumento. B: Aspecto de uma colônia isolada. C: Aspecto do micélio do isolado. Imagens obtidas com sete dias de cultivo do isolado. Prancha completa de todos os isolados, com imagem da placa (90x15 mm) mostrando o aspecto cultural do crescimento em meio sólido, disponível no Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (LGMB) - Departamento de Microbiologia, BioAgro/UFV.



Apêndice B - Imagem ilustrativa do gel de agarose 0.8% com o produto da reação de PCR de ~640 pares de bases realizada para todos os isolados. M = marcador 1kb DNA ladder (KASVI); 1 = CAB-C 2; 2 = CAB-C 5; 3 = CAB-C 12; 4 = CAB-C 16; 5 = CAB-C 17; 6 = CAB-C 19; 7 = CAB-C 50; 8 = CAB-C 63; 9 = CAB-S 104; 10 = branco a reação (sem DNA); 11 = controle positivo da reação (*Streptomyces rochei* – INCQS 00320); 12 = controle negativo, *Escherichia coli* ATCC 10799 INCQS 00217.

Capítulo 3

Ação de *Streptomyces* sp. na promoção do crescimento vegetal e na supressão da doença mal-do-Panamá em bananeira

Resumo

Bactérias do gênero *Streptomyces* são largamente estudadas em função do seu potencial para a produção de metabólitos secundários de amplo espectro de ação e tem despertado grande interesse na agricultura por apresentar potencial na promoção do crescimento de plantas (PGP - *Plant Growth Promoter*) e/ou de atuarem como agentes de biocontrole de patógenos. Neste trabalho, o potencial de 12 isolados do gênero *Streptomyces* em promover o crescimento de bananeira da variedade Prata anã e atuar na supressão da doença mal-do-Panamá, doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), foi avaliado em condições de casa de vegetação. Plantas micropropagadas foram transplantadas para tubetes e, posteriormente, para sacos plásticos e inoculadas somente com actinobactérias, com actinobactérias e *Foc*, plantas sem inoculação (controle negativo) e plantas inoculadas apenas com *Foc* (controle positivo). Foram testados treze tratamentos para avaliação do crescimento vegetal e quatorze tratamentos para a avaliação da supressão da doença, com oito repetições por tratamento e delineamento inteiramente casualizado. Diferentes medidas de desenvolvimento da planta foram avaliadas para ambos os experimentos e, para o experimento de supressão da doença mal-do-Panamá, a análise do período de incubação, incidência e severidade da doença dos sintomas internos e externos, respectivamente (com auxílio de uma escala de notas descritiva), sendo transformados em índice de doença (%) e utilizado para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os resultados da avaliação da PGP mostraram que 7 tratamentos apresentaram efeito no desenvolvimento das plantas ($p \leq 0,05$). Destes, o tratamento com o isolado CAB-C 50 foi o mais promissor, em que mostrou um maior desenvolvimento das plantas em função das variáveis avaliadas: altura da planta, diâmetro do pseudocaule, número de folhas, massa fresca e massa seca ($p < 0,01$ e $0,001$), com as medidas de emissão foliar e módulo colorimétrico não sendo eficientes para avaliar diferença no desenvolvimento das plantas entre os diferentes tratamentos. Em relação à supressão da doença mal-do-Panamá, foram observadas reduções da incidência e da severidade final da doença na maioria dos tratamentos com as *Streptomyces* sp., sendo observada também uma redução do acúmulo da doença ao longo do tempo, constatada pela análise da curva de progresso da doença,

bem como pelos valores da AACPD. Os tratamentos com os isolados CAB-C 12, CAB-C 21, CAB-C 24, CAB-C 25 e CAB-C 50 foram os mais promissores para a supressão da doença, com destaque para o CAB-C 12 e para o CAB-C 50. Um consórcio com os microrganismos mais promissores para o controle do *Foc* (CAB-C 24, CAB-C 25, CAB-C 50 e CAB-S 69) *in vitro* foi avaliado em um segundo momento, com a repetição do experimento, o qual se mostrou promissor para a supressão da doença mal-do-Panamá *in vivo*, representando uma estratégia promissora para a supressão da doença mal-do-Panamá em condições *in vivo*. Dessa forma, dentre as actinobactérias avaliadas, há isolados promissores para a PGP de bananeira da variedade Prata anã, bem como para atuar na supressão da doença mal-do-Panamá, sendo os isolados CAB-C 12 e CAB-C 50 *Streptomyces* os mais promissores. E, além disso, alguns destes isolados podem reduzir a severidade da doença tanto isolados quanto em consórcio com outras *Streptomyces*. Assim, são necessários mais estudos para elucidar o(s) mecanismo(s) de promoção de crescimento supressão da doença que estes isolados podem apresentar.

1. Introdução

O aumento da produtividade agrícola mundial, sobretudo em grande escala, ocorre principalmente pelo uso de fertilizantes sintéticos, a fim de promover o desenvolvimento vegetal, e por defensivos agrícolas químicos, visando o controle de doenças (Palaniyandi et al., 2013; Fisher et al., 2018), embora nos últimos anos muitos países têm proibido a aplicação de pesticidas, bem como de fertilizantes sintéticos, devido ao uso excessivo e/ou ao mal uso destes (Ntalli & Menkissoglu-Spiroudi, 2011; Palaniyandi et al., 2013; Fisher et al., 2018). No âmbito do aumento significativo da população global, estimado em 9.3 bilhões de habitantes em 2050, faz-se necessária a integração de práticas sociais, econômicas e ambientais a fim de aumentar a produção agrícola de forma sustentável (Glick, 2012; DESA, 2017; FAO, 2017). Neste panorama, a produtividade mundial de banana tem aumentado (FAOSTAT, 2018a) e, atrelado a isso, o uso de fertilizantes e pesticidas sintéticos, sendo o Brasil o terceiro maior produtor desta fruta e também está entre os países que mais utilizam agroquímicos, principalmente pesticidas (FAOSTAT, 2018b; FAOSTAT, 2018c).

Atualmente, doenças fúngicas das principais culturas agrícolas causam prejuízos perenes de aproximadamente 20% em todo o mundo (Fisher et al., 2018). Neste contexto, a doença mal-do-Panamá, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), é uma das mais

impactantes da cultura da bananeira (Ma et al., 2013; Ploetz et al., 2015a; Silva et al., 2016). *Foc* é um fungo do solo, considerado de distribuição global, pois está presente em todas as áreas produtoras de banana, responsável por perdas significativas de produção, possuindo alta capacidade de sobrevivência no solo, mesmo na ausência do seu hospedeiro, por formar estruturas de resistência chamadas de clamidósporos e, qualquer alteração no solo, pode refletir diretamente positiva ou negativamente no desenvolvimento da doença (Stover, 1962; Wang et al., 2013; Ploetz et al., 2015a; Canal do Produtor, 2015; Cordeiro et al., 2016; Panama Disease, 2016). A principal forma de controle do mal-do-Panamá é a utilização de variedades resistentes, embora medidas preventivas como: a exclusão do patógeno pelo uso de mudas sadias e área de plantio livres do patógeno, implantação de barreiras físicas, uma nutrição vegetal eficiente, correção do pH do solo, plantios em solos ricos em matéria orgânica podem auxiliar no controle do patógeno e, conseqüentemente, reduz o desenvolvimento da doença (Zhang et al., 2011; Cordeiro & Matos, 2012; Palaniyandi et al., 2013; Ploetz et al., 2015a; Cordeiro et al., 2016).

Mal-do-Panamá é uma doença considerada policíclica, apresentando vários ciclos de infecção em plantios de banana (Ploetz, 2015). Alguns fatores regem a dinâmica da doença em campo, influenciando diretamente na epidemiologia da doença (Ploetz, 2015; Dita et al., 2018) e a análise dos componentes epidemiológicos é fundamental para o manejo da doença ao longo do tempo, de forma que permita uma redução do progresso da doença e, conseqüentemente, redução de custos de produção (Vale et al., 2004; Dita et al., 2018; Bidabadi & Sijun, 2018).

Como alternativa às práticas agrícolas que agridem o meio ambiente, a utilização de microrganismos com potencial de promoção do crescimento vegetal (PGP - *Plant Growth Promoter*) e de biocontrole de fitopatógenos surge como uma necessidade urgente, embora a aplicação de microrganismos benéficos em plantios comerciais ainda é escassa, devido aos poucos estudos em campo (Zhang et al., 2017; Orozco-Mosqueda et al., 2018). Neste contexto, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR - *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) atuam de forma direta na promoção do crescimento vegetal por aumentar a disponibilidade de nutrientes assimiláveis pela planta, bem como pela produção de hormônio ou, indiretamente, por apresentarem atividade de biocontrole contra fitopatógenos, diminuindo o efeito negativo causado por estes às plantas (Glick, 2012; Orozco-Mosqueda et al., 2018).

Dentre as bactérias, o gênero *Streptomyces* vem sendo estudado neste cenário dado a expressiva capacidade de produzir compostos antimicrobianos, sideróforos, enzimas hidrolíticas

e/ou desintoxicantes, sendo relatados seu potencial na atuação tanto no biocontrole dos fitopatógenos como na promoção do crescimento vegetal e estimulando à resposta imune da planta (Beneduzi et al., 2012; Palaniyandi et al., 2013; Hamedi et al., 2015), estas podem ser isoladas e utilizadas (células bacterianas ou propágulos celulares - esporos), visando a promoção do crescimento vegetal e/ou controle de fitopatógenos em biofertilizantes, como também a identificação de metabólitos para formulação de pesticidas naturais (Glick, 2012; Hamedi et al., 2015). Este gênero, pertencente ao filo Actinobacteria (Waksman & Henrici, 1943; Ludwig et al., 2012), compreende 848 espécies e 38 subespécies (LPSN, 2018), caracterizadas como Gram positivas, aeróbias, quimiorganotróficas, produtoras de hifas vegetativas de 0,5 - 2,0 μm de diâmetro, com poucas espécies relatadas como patogênicas a animais e plantas (Ludwig et al., 2012). Muitas espécies são capazes de se adaptar no solo e outros ambientes com condições inóspitas, devido principalmente ao seu vasto potencial genético e capacidade de utilizar diferentes compostos como fonte de carbono e energia, sendo consideradas eficientes competidoras (Ludwig et al., 2012; Kemung et al., 2018).

Cerca de sessenta por cento (60%) dos novos antibióticos descobertos entre os anos 50 e 70 foram obtidos a partir de actinobactérias, quase totalmente de espécies do gênero *Streptomyces* (Berdy, 2005; Berdy, 2012) e, muitas bactérias deste gênero, vem sendo estudadas e avaliadas em condições de laboratório quanto ao potencial de controle biológico de fitopatógenos e promoção do crescimento vegetal, embora poucos trabalhos ainda em condições de casa de vegetação e de campo (Javaid & Sultan, 2013; Palaniyandi et al., 2013; Hamedi et al., 2015; Chen et al., 2018; Du et al., 2018; Han et al., 2018; Ohike et al., 2018). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de isolados do gênero *Streptomyces* em promover o crescimento de plantas de bananeira da variedade Prata anã, bem como avaliar a capacidade desses isolados em atuarem na supressão da doença mal-do-Panamá em condições de casa de vegetação.

2. Material e métodos

2.1. Isolados utilizados

Doze isolados pertencentes à Coleção de Actinobactérias (CAB. C = isolados de amostra de composto; S = isolados de amostra de solo) do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, CAB-C 12, CAB-C 21, CAB-C 24, CAB-C 25, CAB-C 50, CAB-S 66, CAB-S 67, CAB-S 69, CAB-S 70, CAB-S 71, CAB-S 72, CAB-S 96, foram utilizados para avaliação do potencial *in vivo*

na promoção do crescimento de mudas de bananeira da variedade Prata Anã e na supressão da doença mal-do-Panamá por apresentarem atividade antagonista *in vitro* frente ao fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*). Todos os isolados foram caracterizados fenotipicamente (Apêndice A), bem como pelo sequenciamento do gene 16S DNAr em trabalho prévio. O fungo *Foc* utilizado, foi o mesmo utilizado nos testes prévios de antagonismo *in vitro*, o isolado 54P, cedido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, considerado patogênico à variedade Prata Anã.

2.2. Preparo do substrato e do solo para transplante das mudas

O substrato para o transplante das mudas micropropagadas para tubetes foi preparado com proporções de fibra de coco (30 kg), palha de arroz carbonizada (5 kg), composto orgânico (5 kg), óxido de cálcio (500 g), nitrato de potássio (50 g), fosfato reativo natural (500 g) e micronutrientes (5 g - boro, zinco, cobre, manganês e molibdênio), todos misturados com auxílio de betoneira com adição de água para umedecer o quanto necessário, seguindo as recomendações da empresa Sítio Barreiras LTDA em relação ao plantio padrão. Os tubetes de 150 mL foram preenchidos com o substrato e irrigados antes do transplante. O preparo do solo foi realizado com uma proporção de 3:1 (v/v) de solo/substrato comercial (Tropstrato HT Hortaliças – Vida Verde, Tecnologias em substratos), com 20% de composto orgânico junto ao substrato comercial, estes misturados em betoneira e transferidos dois litros para sacos plásticos pretos (22 x 35 x 0,10 cm). O solo foi umedecido periodicamente para melhor estabilização até o transplante das mudas. As análises físico-químicas do substrato e do solo foram realizadas pelo Laboratório de Análise de Solo Viçosa (Apêndice B).

2.3. Obtenção das mudas de bananeira e transplante

As mudas micropropagadas foram obtidas da empresa Flora Biotecnologia LTDA – Santa Catarina (SC), Brasil, todas pertencentes à variedade Prata anã (grupo genômico AAB). Estas foram separadas em bandejas por tamanho, com cerca de 6 cm de altura, para compor repetição de cada tratamento, diminuindo a variação dentre os diferentes tratamentos. As mudas foram transplantadas para os tubetes contendo o substrato em aberturas centrais com cerca de 3 cm de profundidade previamente identificados por tratamentos. Estas foram mantidas sob sombrite, com temperatura média (medidas tomadas às 10 e 16 horas de cada dia) de 29,5 °C (médias de mínima

19 °C e máxima 39 °C) e umidade 70% (Fig. 2). As plantas foram irrigadas duas vezes ao dia, de 15 a 30 mL de água conforme as condições do ambiente e exigência das plantas, com seringa. As mudas foram adubadas a partir da segunda semana do transplante de forma alternada com MAP (Mono-Amônio-Fosfato) e NK (Nitrogênio e Potássio) em uma concentração de 0,05 g NK e 0,08 g de MAP por planta, 5 e 3 doses, respectivamente.



Figura 2: Características gerais das mudas e condições utilizadas nos experimentos. A – Separação das mudas por tamanho para compor uma repetição de cada tratamento; B – Muda de bananeira com cerca de 6 cm representando o porte das mudas selecionadas para compor os experimentos; C e D – Mudas transplantadas para os tubetes de 150 mL e mantidas no sobrite por 18 dias.

Após 18 dias no sombrite, as plantas foram transferidas para bancadas “ao sol” dentro da casa de vegetação, para aclimação antes da inoculação com o *Foc*, para evitar um maior estresse, apresentando médias de temperatura e umidade de 28 °C (média da mínima 16,5 °C e 33 °C da máxima) e 46,5%, respectivamente. Após dezenove dias de aclimação e um maior desenvolvimento das plantas, estas foram transferidas para os sacos contendo solo já inoculado com o *Foc*. Neste momento, as plantas apresentavam em média 9,2 cm de altura e 5,6 folhas. As plantas foram regadas duas vezes ao dia com um volume de 50 a 100 mL de água e adubadas uma

vez com MAP e NK após o transplante para os sacos.

2.4. Preparo do inóculo bacteriano e inoculação

Dez microlitros (10 µl) de suspensão bacteriana do estoque de cada uma dos 12 isolados foram inoculados sobre toda a superfície do meio BDA pH 7,0 sobre papel celofane e, após sete dias de incubação a 27 °C, toda biomassa bacteriana foi raspada para 20 mL de solução salina (0,85%) e agitada levemente em agitador do tipo vórtex por dez segundos para homogeneizar (de acordo com teste e padronização prévia), para obtenção de uma suspensão com concentração final de 1×10^8 UFC/mL. Um mililitro (1 mL) da suspensão foi utilizado para diluição seriada e plaqueamento para contagem de UFC/ml. Foram realizadas duas inoculações com as actinobactérias, adicionando-se 1 mL da suspensão bacteriana na base de cada planta de bananeira (Qin et al., 2015 com modificações - duas inoculações) no dia do transplante e sete dias após.

2.5. Preparo do inóculo fúngico e inoculação

O *Foc* foi reativado a partir do estoque em meio BDA pH 5,5 e incubado à 25 °C por 7 dias. Uma suspensão de conídios em uma concentração de 1×10^6 conídios/mL foi preparada adicionando-se 3 mL de água destilada esterilizada sobre o fungo na placa e feita uma raspagem com alça de Drigalsky, filtrados para remover hifas/ micélio em seringa com gaze, todos previamente esterilizados. A contagem para ajuste da concentração foi realizada em câmara de Neubauer (Improved Bright-line - Optik Labor) e ajustada para a concentração final de 1×10^6 conídios/mL.

A inoculação foi realizada em um furo feito no centro do solo no saco por um tubete (150 mL) vazio e desinfestado com álcool 70%. Um mililitro (1 mL) da suspensão na concentração de 1×10^6 conídios/mL foi depositada com auxílio de micropipeta ao longo da superfície do furo no centro do saco, antes do transplante das mudas dos tubetes para o saco.

2.6. Montagem dos experimentos

Dois experimentos simultâneos foram montados em casa de vegetação do Departamento de Microbiologia Agrícola da UFV do período de abril a julho de 2018, a fim de avaliar a promoção do crescimento vegetal e a supressão da doença mal-do-Panamá, todos com as mesmas condições experimentais (substrato, solo, adubação, irrigação, variedade de bananeira, isolados bacterianos,

condições de casa de vegetação). Sendo a única diferença, a inoculação com o *Foc* para o experimento de avaliação da supressão da doença mal-do-Panamá. A finalização do experimento foi determinada com base em outros trabalhos (Rodriguez et al., 2011; Rebouças, 2018; Chen et al., 2018; Ribeiro et al., 2018), bem como levando em consideração o desenvolvimento das plantas e o aparecimento e desenvolvimento dos sintomas, 60 dias após a inoculação.

Estes experimentos (supressão da doença mal-do-Panamá e promoção do crescimento vegetal) foram repetidos 14 dias após a montagem dos dois primeiros, seguindo a mesma estratégia experimental, incluindo dois tratamentos Mix, um consórcio de microrganismos composto por quatro isolados: CAB-C 24, CAB-C 25, CAB-C 50 e CAB-S 69, os quais apresentaram o melhor desempenho no controle de *Foc in vitro* em trabalho anterior. Estes quatro microrganismos foram avaliados previamente quanto ao crescimento para verificar a compatibilidade do consórcio, sendo estes coinoculados em uma mesma placa de Petri (60x15 mm), utilizando 10 µl de suspensão do estoque de cada isolado em gotas equidistantes em placa de Petri, sendo observado o crescimento após 7 dias de inoculação. Este experimento foi finalizado aos 85 dias após a inoculação como sugerido por Ribeiro et al., 2018.

2.7. Avaliação da promoção do crescimento vegetal

Treze tratamentos compostos por 8 plantas cada foram distribuídos totalmente ao acaso, sendo aleatorizado a cada semana em bancadas na casa de vegetação. Doze isolados bacterianos (tabela 2) foram utilizados para as avaliações, com um tratamento apenas com mudas de bananeira inoculadas com solução salina (NaCl - 0,85%) representando o controle negativo. Medidas de desenvolvimento da planta foram tomadas ao final do experimento, após noventa e oito (98) dias de montagem, para todas as plantas, tanto para aquelas do experimento de avaliação da promoção do crescimento vegetal, quanto para a avaliação do controle da doença mal-do-Panamá. As variáveis abaixo foram avaliadas:

Altura da planta: A altura da planta foi medida com régua graduada da base do pseudocaule da planta até a inserção da folha 1; *número de folhas:* a contagem do número de folhas foi feita considerando todas as folhas vivas e abertas; *diâmetro do pseudocaule:* o diâmetro do pseudocaule foi medido utilizando paquímetro digital (Mitutoyo Absolute DIGIMATIC), avaliado na altura de 3 cm da base do pseudocaule, padronizando a avaliação na posição menos larga para todas as plantas; *taxa de emissão foliar:* a avaliação da emissão da taxa foliar foi realizada marcando a

folha 1 de cada planta no momento do transplante e, a cada semana, a avaliação do desenvolvimento de uma nova folha foi registrado; *massa fresca e massa seca da parte aérea*: a massa fresca foi realizada utilizando apenas a parte aérea da planta mais o rizoma. Para realização da massa seca, as mudas foram colocadas em sacos de papel e levadas para secagem em estufa de circulação forçada a 65 °C, até atingir massa constante; *colorimetria/pigmentação*: dados dos atributos L, a, c, b e h foram obtidos utilizando o aparelho colorímetro (Color Reader CR-10 – Kinoca Minolta Sensing, Inc.). A avaliação foi realizada na folha três de cada planta, padronizado para todas as plantas o lado esquerdo do limpo foliar, evitando as áreas com pigmentações de antocianina típicas da variedade.

2.8. Avaliação da supressão da doença mal-do-Panamá

Para a avaliação da supressão da doença, 14 tratamentos foram definidos. Plantas tratadas com 12 isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Streptomyces* plantadas em sacos com solo infestado com o fungo *Foc*, sendo os controles do experimento: mudas de bananeira tratadas com solução salina (NaCl - 0,85%) (negativo) e mudas inoculadas apenas com o *Foc* (positivo), distribuídas totalmente ao acaso em bancadas em casa de vegetação.

Após um mês de inoculação com o patógeno, as plantas foram avaliadas diariamente para a observação do período de incubação, período que compreende o momento da inoculação até o surgimento dos primeiros sintomas externos (Cordeiro, 1997; Ribeiro et al., 2018). A partir desse momento, a severidade da doença foi avaliada utilizando a escala de notas descritiva proposta por Dita et al. (2014) composta por 5 categorias, em que: 1 = sem sintomas; 2 = amarelecimento inicial nas folhas mais velhas/baixas; 3 = amarelecimento completo de todas as folhas mais velhas/baixas, com alguma descoloração nas folhas mais novas; 4 = todas as folhas com intenso amarelecimento; 5 = planta morta (Fig. 3). As avaliações dos sintomas externos foram realizadas a cada quatro dias até a finalização do experimento, após 61 dias da inoculação.

Ao final do experimento, as plantas foram removidas do solo e a incidência da doença e a severidade dos sintomas internos (comprometimento do sistema vascular) foram avaliados utilizando a escala para sintomas internos proposta por Dita et al. (2014), como segue: 1 = sem sintomas; 2 = descoloração inicial do rizoma; 3 = leve descoloração ao longo de todo o sistema vascular; 4 = rizoma com quase todo o tecido interno mostrando necrose; 5 = rizoma totalmente necrótico (Fig. 3). Para isso, um corte transversal foi feito no rizoma de cada planta de todos os

tratamentos e observado o comprometimento do sistema vascular. Assim, foram coletados dados das variáveis: severidade externa da doença (sintomas externos da doença), incidência e severidade interna da doença (sintomas internos) e estes foram utilizados para as análises comparativas dos tratamentos.

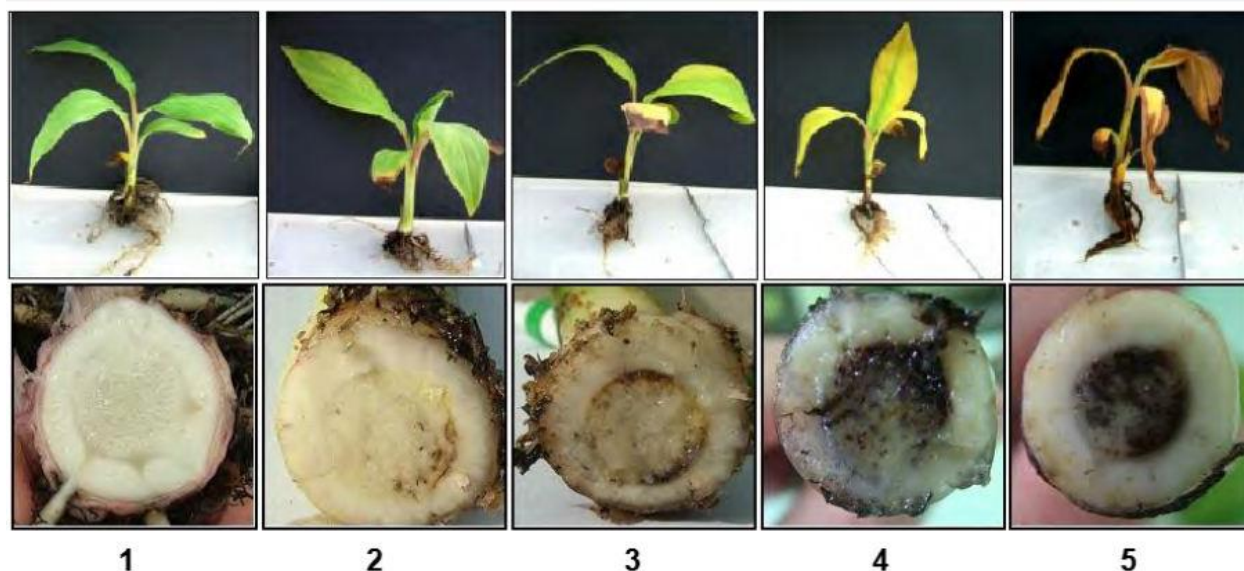


Figura 3: Parâmetros para avaliação dos sintomas da doença mal-do-Panamá em plantas de bananeira em condições de casa de vegetação, baseada nos sintomas externos (parte superior da escala) e nos sintomas internos (parte inferior da escala). Fonte: Dita et al., 2014.

Com os dados dos sintomas externos e internos foi calculado índice de doença (ID) pela seguinte fórmula: Índice de severidade da doença (%) = $[\sum(\text{escore} \times \text{número de plantas com o mesmo escore}) / (\text{número máximo de escore da escala} \times \text{número total de plantas avaliadas}) \times 100$ (McKinney, 1923). A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD: *Area Under the Disease Progress curve* – AUDPC), que representa o acúmulo da doença no tempo de avaliação, foi calculada utilizando os dados das 8 avaliações, pela fórmula a seguir:

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

Em que:

y_i = severidade da doença, baseada no índice da doença, no momento inicial (i);

y_{i+1} = severidade da doença no momento da avaliação subsequente ($i + 1$);

t_i = tempo (dias) no momento da avaliação i ;

t_{i+1} = tempo (dias) no momento da avaliação subsequente $i + 1$;

n = número total de avaliações (Jeger & Viljanen-Rollinson, 2001; Vale et al., 2004).

2.9. Análises estatísticas

A análise comparativa dos dados de desenvolvimento das plantas foi realizada pelo teste

de comparação de médias de todos os tratamentos com o tratamento controle pelo teste Dunnett a 0,1%, 1% e 5% de probabilidade de erro e, para os tratamentos que diferiram do controle, foi realizado o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para a representação gráfica das curvas de progresso da doença bem como da severidade dos sintomas internos, foram utilizados os pacotes ggplot2 e agricolae no programa R *software* (versão 3.4.1 <https://www.rstudio.com/>).

3. Resultados

3.1. Promoção do crescimento de bananeiras

Os resultados das variáveis analisadas estão disponíveis na tabela 2 a seguir.

Tabela 2: Valores médios dos diferentes parâmetros mensurados em mudas de bananeira inoculadas com doze isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces*, a fim de avaliar a promoção do crescimento vegetal.

Tratamentos	Altura (cm)	Nº de folhas	Diâmetro do pseudocaule (mm)	MFPA (g)	MSPA (g)
Controle	14,28	6,0	16,43	57,73	7,92
CAB-C 12	15,90	6,5	17,45	68,88	9,31
CAB-C 21	15,46	6,0	16,88	66,18	9,20
CAB-C 24	15,41	6,4	18,14	69,75**	9,17
CAB-C 25	16,55***	6,8*** <i>b</i>	18,35	72,02***	10,23****
CAB-C 50	16,61***	7,1****	19,22***	74,47****	9,76***
CAB-S 66	16,26**	6,4	17,61	70,91**	9,64***
CAB-S 67	15,61	6,3	17,68	63,77	8,73
CAB-S 69	13,96	6,4	16,91	57,71	7,99
CAB-S 70	14,75	6,5	17,40	60,73	8,42
CAB-S 71	14,20	6,4	15,65	54,88	7,92
CAB-S 72	13,99	7,0**** <i>b</i>	17,35	59,53	8,14
CAB-S 96	14,94	6,1	16,91	57,92	7,65

MFPA = Massa fresca correspondente à parte aérea da planta; MSPA = Massa seca correspondente à parte aérea da planta.

Teste Dunnett de comparação entre todos os tratamentos com o controle e teste Tukey a 5% de probabilidade para os tratamentos que diferiram do controle. Número não seguidos de letras e nem de símbolos, não diferem do controle. Em cada coluna, números seguidos pelos símbolos **, *** e **** diferem do tratamento controle pelo teste Dunnett e, as letras minúsculas são referentes à significância do teste Tukey a 5% de probabilidade. ** $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.001$.

Além dos dados mostrados na tabela 2, foram avaliados também a taxa de emissão foliar e módulos de leitura da colorimetria, os quais não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao controle (dados não mostrados). O isolado CAB-C 50 foi o único isolado que apresentou diferença ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$) em todos os parâmetros avaliados em comparação ao controle (altura da planta, o número de folhas, o diâmetro do pseudocaule e massa fresca) (Fig. 4); o isolado CAB-C 25 apresentou quatro parâmetros (altura, número de folhas,

massa fresca e massa seca); o CAB-S 66 diferiu em três parâmetros (altura, massa fresca e massa seca); e, os isolados CAB-C 24 e CAB-S 72 diferiram apenas em um parâmetro cada, massa fresca e número de folhas, respectivamente.



Figura 4: Panorama das plantas no final do experimento de avaliação da promoção do crescimento vegetal. As plantas foram avaliadas no final do experimento, após 3 meses e uma semana de montagem do mesmo. Da esquerda para a direita, tratamentos: Controle bananeira; CAB-C 12; CAB-C 21; CAB-C 24; CAB-C 25; CAB-C 50; CAB-S 66; CAB-S 67; CAB-S 69; CAB-S 70; CAB-S 71; CAB-S 72; CAB-S 96. Planta com a seta indicando o tratamento CAB-C 50 que apresentou o maior desenvolvimento das plantas).

3.2. Controle da doença mal-do-Panamá

3.2.1. Efeito das bactérias do gênero *Streptomyces* na supressão da doença mal-do-Panamá

Ao longo das avaliações do experimento, foi possível observar todos os sintomas típicos da doença mal-do-Panamá, validando a patogenicidade do *Foc* (Fig. 4).



Figura 4: Sintomas típicos da doença mal-do-Panamá em plantas de bananeira da variedade Prata Anã (setas). A: Murcha foliar. Na imagem, uma planta representando cada estágio da escala de notas, da planta sadia até a planta

morta; B: estreitamento do limbo foliar das folhas mais novas; C: Rachaduras no pseudocaule. Todos estes representando os sintomas externos; D: Comprometimento dos vasos condutores (sintomas internos).

A comparação dos tratamentos (isolados analisados) no efeito da supressão da doença foi realizada a partir dos parâmetros: período de incubação, severidade final da doença, progresso da doença ao longo do tempo, área abaixo da curva de progresso da doença e a incidência dos sintomas internos.

Sintomas externos

As 8 avaliações realizadas a partir da observação dos sintomas externos foram transformadas em índice de doença e utilizadas para avaliar o progresso da doença (análise temporal) e a severidade final da doença (Fig. 5A), bem como a AACPD (Fig. 5B).

Houve variação no período de incubação e na dinâmica temporal da doença, refletindo em valores diferentes da área abaixo da curva de progresso da doença entre os diferentes tratamentos. Não foram observados sintomas externos nas plantas do tratamento CAB-C12 ao longo de todo o experimento.

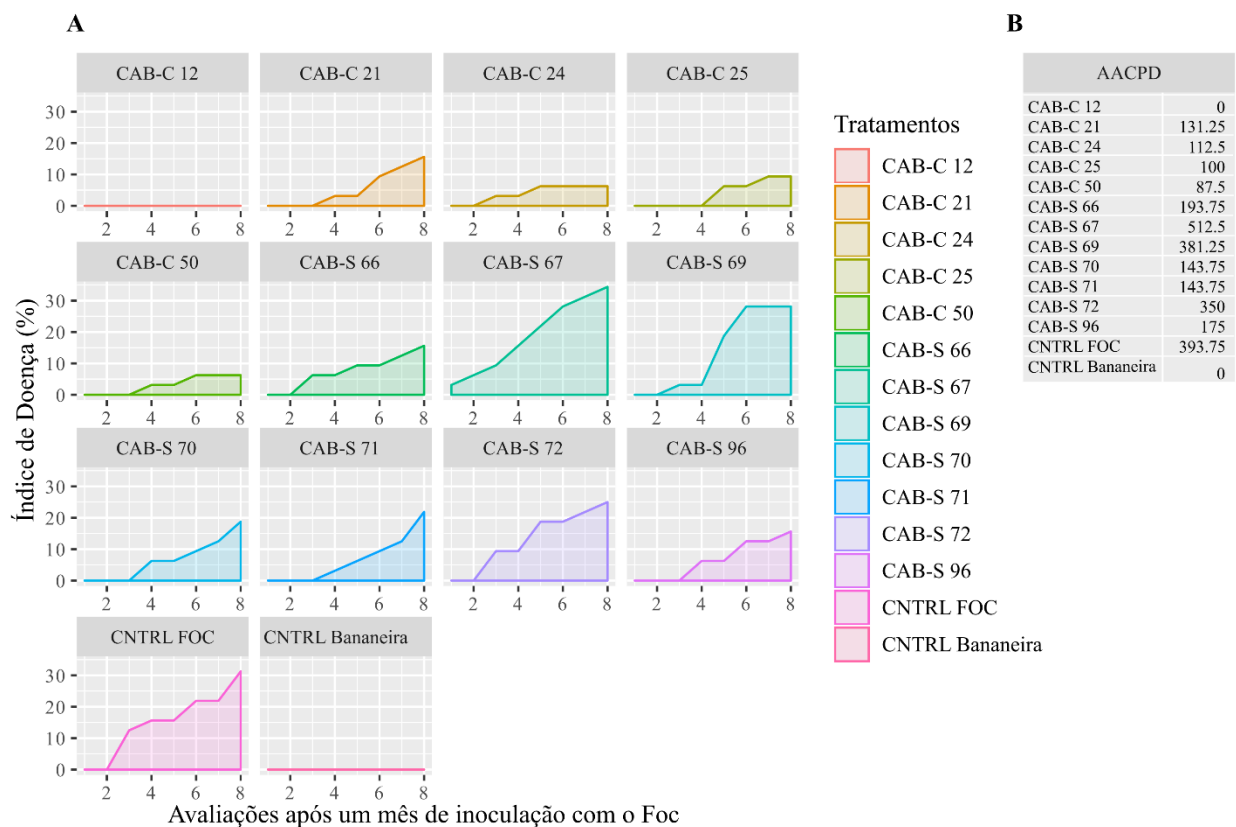


Figura 5. Efeitos dos tratamentos com diferentes isolados do gênero *Streptomyces* sobre o controle da doença mal-do-Panamá na variedade Prata Anã. Todos os tratamentos foram inoculados com uma suspensão de conídios de *Foc* (1×10^6 conídios/mL) com exceção do controle negativo, apenas bananeira (CNTRL Bananeira). O tempo zero (0) no

gráfico representa o início das avaliações, após um mês de inoculação com o patógeno. A: Representação do progresso da doença construída com base nos valores de índice doença (ID) obtidos a partir das 8 avaliações dos sintomas externos utilizando a escala de notas proposta por Dita et al. (2014); B: Valores do cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os diferentes tratamentos.

O tratamento com o isolado CAB-C 25 apresentou o período incubação mais prolongado, a partir da quinta avaliação, 51 dias após a inoculação, seguido pelos tratamentos com os isolados CAB-C 21, CAB-C 50, CAB-S 70, CAB-S 71 e CAB-S 96, em que os sintomas foram observados a partir de 49 dias após a inoculação. Os tratamentos CAB-C 24, CAB-S 66, CAB-S 69 e CAB-S 72, não mostraram diferença em relação ao tratamento controle *Foc*, com o aparecimento dos sintomas após 42 dias de inoculação e o tratamento CAB-S 67 apresentou o mais curto período de incubação, sendo os sintomas observados a partir da primeira avaliação, com um mês de experimento.

Ao final do experimento, os tratamentos CAB-C 12 (0 %), CAB-C 24 (6,25 %) e CAB-C 50 (6,25 %) apresentaram os menores índices de doença (Fig. 5A e Fig. 6), seguidos pelos tratamentos CAB-C 25 (9,37 %), CAB-C 21, CAB-S 66 e CAB-S 96, todos com 15,62 %, CAB-S 70 (18,75%), CAB-S 71 (21,87 %), CAB-S 72 (25 %), CAB-S 69 (28,12 %) e CAB-S 67 (34,37 %), com o tratamento controle positivo, inoculado com o patógeno *Foc*, apresentando um ID de 31,25 %.

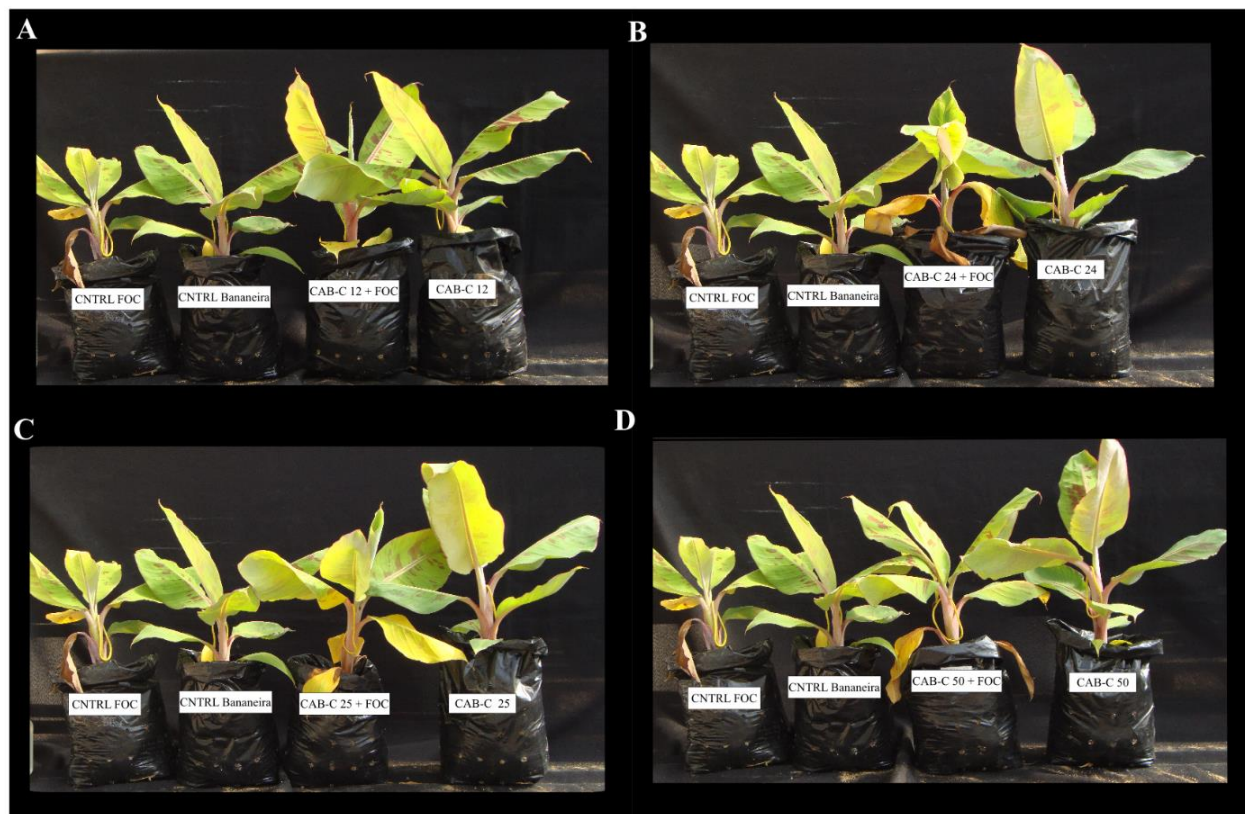


Figura 6: Plantas representando a média dos melhores tratamentos em relação a supressão da doença mal-do-Panamá e promoção do crescimento vegetal. A: Controle *Foc*; Controle bananeira; CAB-C 12 + *Foc* e CAB-C 12; B: Controle *Foc*; Controle bananeira; CAB-C 24 + *Foc*; CAB-C 24; C: Controle *Foc*; Controle bananeira; CAB-C 25 + *Foc* e CAB-C 25; D: Controle *FOC*; Controle bananeira; CAB-C 50 + *Foc* e CAB-C 50.

O acúmulo da doença ao longo do tempo experimental foi verificado pelo cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Fig. 5B), a qual evidenciou variação entre os tratamentos, sendo a menor observada para o tratamento CAB-C 50 (87,5). O tratamento com o isolado CAB-S 67 apresentou o maior valor da AACPD (512,5) e todos os demais tratamentos apresentaram valores inferiores ao apresentado pelo controle positivo *Foc* (393,75).

Sintomas internos

Os sintomas internos permitiram calcular a incidência da doença e observar o grau de comprometimento do sistema vascular. Todas as plantas do tratamento controle positivo (*Foc*) apresentaram sintomas internos de lesões da doença, o que corresponde a uma incidência de 100%, também observado nos tratamentos CAB-S 71 e CAB-S 72. Não foram observados sintomas internos no tratamento CAB-C 12. Nos tratamentos CAB-C 21, CAB-C 24, CAB-C 25 e CAB-C 50 a incidência correspondeu a 37,5%, os tratamentos CAB-S 66, CAB-S 67, CAB-S 69, CAB-S

70 e CAB-S 96 apresentaram 62,5%, 87,5%, 75%, 50% e 75% de incidência da doença, respectivamente.

Na repetição do experimento (supressão da doença e promoção do crescimento montados quatorze dias após a montagem dos dois primeiros) dentre os 85 dias, foram realizadas 15 avaliações dos sintomas externos e, o tratamento Mix - consórcio de microrganismos (isolados CAB-C 24, CAB-C 25, CAB-C 50 e CAB-S 69) - retardou o início dos sintomas, aumentando o período de incubação, com o aparecimento dos sintomas apenas 40 dias após a inoculação com o patógeno *Foc*, com a taxa de progresso da doença mantendo-se constante até o final do experimento. O índice de doença final, baseado na severidade dos sintomas externos, foi de 3,25% e, do controle 43,75%, com um baixo valor (56,25) da AACPD, quando comparado ao controle positivo *Foc* (779,17) (Fig. 7), e em relação aos sintomas internos, este apresentou 12,5% de incidência da doença.

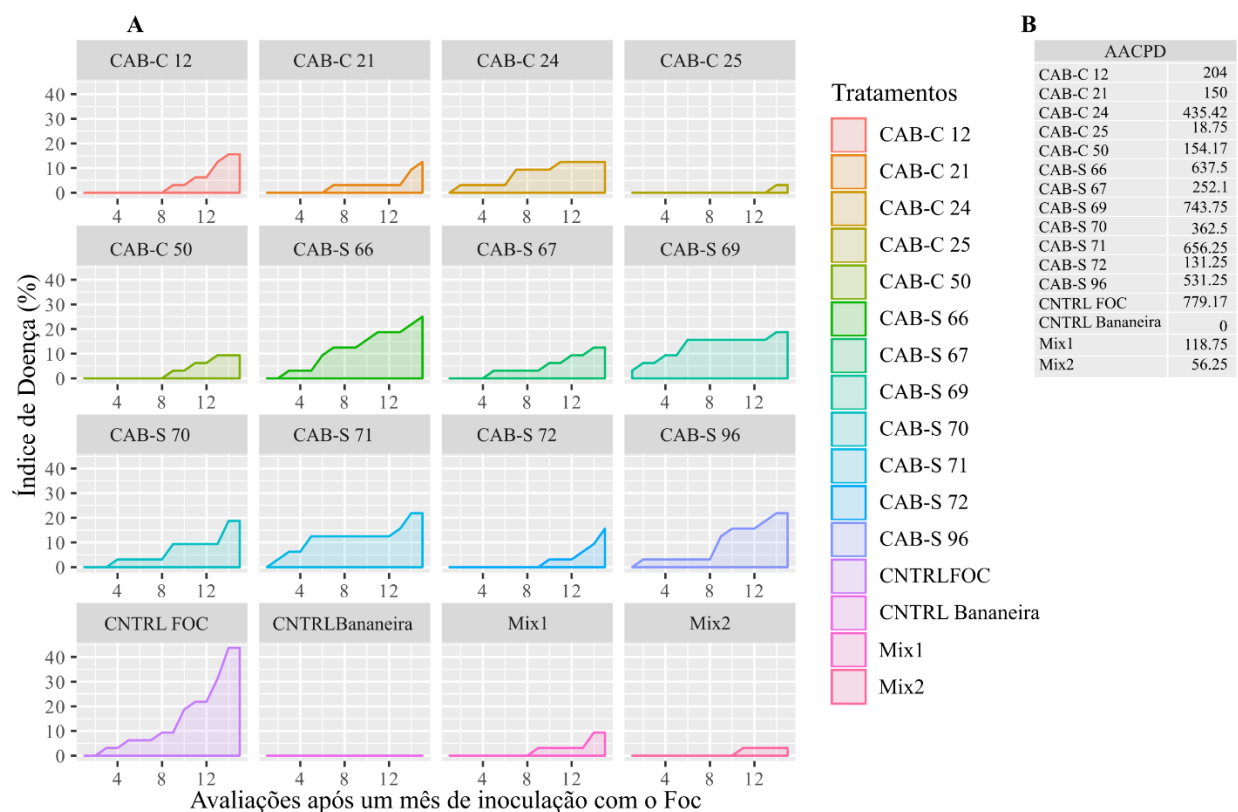


Figura 7: Dados da repetição do experimento. Efeitos dos tratamentos com diferentes isolados do gênero *Streptomyces* sobre o controle da doença mal-do-Panamá na variedade Prata anã. Todos os tratamentos foram inoculados com uma suspensão de conídios de *Foc* (1×10^6 conídios/mL) com exceção do controle negativo, apenas bananeira (CNTRL Bananeira). A: Representação do progresso da doença construída com base nos valores de índice doença (ID) obtidos a partir das 15 avaliações (85 dias de experimento) dos sintomas externos, utilizando a escala de notas proposta por Dita et al., (2014); B: Valores do cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AADPC) para todos os tratamentos.

3.2.1. Desenvolvimento das plantas

Os dados obtidos das avaliações de desenvolvimento das plantas estão expostos na tabela 3. Neste experimento, nenhum dos componentes colorimétricos foi eficiente para mostrar diferença entre os tratamentos, não apresentando diferença significativa entre os mesmos. O tratamento com o isolado CAB-C 21 foi o que apresentou mais variáveis com diferença significativa em relação ao controle, a saber: altura das plantas, massa fresca e massa seca, seguido pelos tratamentos com os isolados CAB-C 24, que apresentou diferença significativa na altura das plantas e massa seca e CAB-S 72, diferindo também na altura e massa seca e, por fim o tratamento com CAB-S 70, apresentando diferença apenas na altura das plantas em relação ao controle.

Tabela 3: Valores médios dos diferentes parâmetros mensurados em mudas de bananeira inoculadas com *Foc* e com doze isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces*, a fim de avaliar a supressão da doença mal-do-Panamá.

Tratamentos	Altura (cm)	Nº de folhas	Diâmetro do pseudocaule (mm)	MFPA (g)	MSPA (g)
CNTRL Bananeira	14,11	6,50	16,27	53,01	7,97
CNTRL <i>Foc</i>	13,63	6,00	15,76	50,42	7,17
CAB-C 12 + <i>Foc</i>	15,03	6,50	16,16	57,85	8,50
CAB-C 21+ <i>Foc</i>	16,81****	6,70	16,66	63,46**	9,81****
CAB-C 24 + <i>Foc</i>	16,11***	6,50	17,69	61,36	9,25***
CAB-C 25 + <i>Foc</i>	15,43	6,63	16,71	56,94	8,82
CAB-C 50 + <i>Foc</i>	15,10	6,38	16,50	57,42	8,41
CAB-S 66 + <i>Foc</i>	15,10	6,00	16,84	54,48	8,11
CAB-S 67 + <i>Foc</i>	15,13	5,38	16,65	52,90	8,37
CAB-S 69 + <i>Foc</i>	15,04	4,88	16,95	56,26	8,14
CAB-S 70 + <i>Foc</i>	15,63 **	5,88	17,01	56,97	8,29
CAB-S 71 + <i>Foc</i>	14,11	6,25	16,20	54,32	7,99
CAB-S 72 + <i>Foc</i>	15,69 **	5,88	17,08	58,19	9,02**
CAB-S 96 + <i>Foc</i>	14,56	6,25	16,69	52,60	8,02

MFPA = Massa fresca correspondente à parte aérea da planta; MSPA = Massa seca correspondente à parte aérea da planta.

Teste Dunnnett de comparação entre todos os tratamentos com o controle e teste Tukey a 5% de probabilidade para os tratamentos que diferiram do controle. Em cada coluna, números seguidos pelos símbolos **, *** e ****. Diferem do tratamento controle pelo teste Dunnnett e, as letras minúsculas são referentes à significância do teste Tukey a 5% de probabilidade.

** $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.001$.

Pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, não houve diferença estatística entre os tratamentos que diferiram do controle, e apenas o tratamento CAB-C 21 apresentou valor de massa fresca diferindo de todos os tratamentos, incluindo o controle, isso pelo teste de Dunnnett.

4. Discussão

Os mecanismos de atuação de *Streptomyces* ssp. como promotoras de crescimento de plantas (PGP - *Plant Growth Promotion*) e em atividades de biocontrole estão bem descritos em algumas revisões sobre o assunto (Glick, 2012; Palaniyandi et al., 2013; Sousa & Olivares, 2016; Subramaniam et al., 2016; Ferrera et al., 2018; Olanrewaju et al., 2018; Vurukonda et al., 2018). Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciaram isolados bacterianos do gênero *Streptomyces* promissores como promotores de crescimento de mudas de bananeira e no controle da doença mal-do-Panamá, uma das mais severas doenças que acometem bananeiras de diferentes variedades (Ploetz, 2005). O isolado CAB-C 50, com todos os parâmetros avaliados diferindo estatisticamente do controle, foi o mais promissor PGP de bananeira da variedade Prata anã nas condições do experimento, seguido pelos isolados CAB-C 25 e CAB-S 66, os quais apresentaram 4 parâmetros diferindo estatisticamente do controle. Essa atividade PGP observada nos isolados, principalmente no CAB-C 50, pode ser devido a um ou a vários mecanismos, como: produção de AIA, produção de sideróforos, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio, produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase (alívio do estresse vegetal), produção de diferentes enzimas e/ou promoção de simbiose (Palaniyandi et al., 2013; Vurukonda et al., 2018), refletindo no desenvolvimento da planta.

O AIA é um fitohormônio pertencente à classe das auxinas que atua na indução da alongação e divisão celular, permitindo o desenvolvimento vegetal (Vurukonda et al., 2018). Aldesuquy et al. (1998) detectaram a produção dos diferentes fitohormônios auxina, giberelina e citocinina produzidos por diferentes espécies do gênero *Streptomyces* com efeito em plantas de trigo. A produção da enzima ACC desaminase, enzima que converte o 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), o qual é o precursor do etileno em plantas, em amônia e α -cetobutarato, diminuindo desta forma, o estresse causado pelo etileno e, conseqüentemente, promovendo o desenvolvimento da planta (Glick, 2005; Palaniyandi et al., 2013), bem como a solubilização do fosfato que, em sua maioria é encontrado no solo em formas complexadas não disponíveis para as plantas, são importantes atividades realizadas por bactérias do gênero *Streptomyces* (Palaniyandi et al., 2013; Vurukonda et al., 2018). Franco-Correa et al. (2010) identificaram e avaliaram 30 actinobactérias, sendo a maioria pertencente ao gênero *Streptomyces*, quanto aos parâmetros: solubilização de fosfato, produção de sideróforos e interação com fungos micorrízicos arbusculares e, a maioria dos isolados apresentaram resultado positivo para os mecanismos

avaliados. Resultados obtidos por El-Tarabily et al. (2008) destacam a atividade de ACC desaminase associada à inoculação com *Streptomyces filipinensis*, reduzindo significativamente a quantidade de ACC em raízes e brotos de tomateiro.

No contexto do controle biológico ou biocotrole, definido como “O uso de organismos vivos para suprimir a densidade populacional ou o impacto de um organismo patogênico específico, tornando-o menos abundante ou menos prejudicial do que seria” (Eilenberg et al., 2001), a atuação de microrganismos benéficos pode ser por antagonismo/antibiose, por competição por espaço e/ou nutrientes com o fitopatógeno ou parasitismo (Eilenberg et al., 2001; Siddikee et al., 2010; Zhang et al., 2011; Palaniyandi et al., 2013). Existem diferentes estratégias de aplicação do controle biológico e, o controle biológico por inoculação é uma estratégia bastante utilizada no âmbito da agricultura (Eilenberg et al., 2001; Johnson, 2010).

Neste trabalho, a observação do aparecimento tardio dos sintomas externos (período de incubação) da doença dentre os tratamentos, principalmente comparando-se ao controle, pode ser em função da atuação das diferentes *Streptomyces* spp. inoculadas como agente de biocontrole no solo. Este inoculo bacteriano pode ter reduzido a taxa de germinação dos conídios de *Foc* em função da produção de metabólitos de efeito antibiótico, como foi observado em testes prévios em laboratório, bem como pela competição por espaço e nutrientes na região rizosférica. Por outro lado, o inóculo bacteriano pode ter, em associação à outros mecanismos, auxiliando do desenvolvimento da planta por algum mecanismo de PGP, diminuindo, dificultando ou mesmo impedindo a penetração das hifas fúngicas nas raízes da bananeira e, consequentemente, diminuindo a colonização e comprometimento do sistema vascular.

A importância da microbiota rizosférica para o desenvolvimento da planta já é bem estabelecida (Philippot et al., 2013; Reinhold-Hurek et al., 2015; Steinauer et al., 2016) e uma rizosfera com atividade microbiana rica, auxilia na supressão de doenças do solo, ou seja, em um ambiente em que há um hospedeiro suscetível, condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença e o microrganismo patogênico, o patógeno não causa a doença ou, se causar, esta apresenta-se em níveis baixos; e, por outro lado, em solos condutivos, com baixa atividade microbiana, um baixo nível de inóculo pode causar sérios danos à cultura (Ploetz, 2015; Dita et al., 2018; Zhao et al., 2018). Neste sentido, a utilização de bioinoculantes com base em diferentes microrganismos com atividade antagonista ou PGP, como utilizando um consórcio de microrganismo (o tratamento Mix avaliado neste trabalho), pode enriquecer a região rizosférica e,

consequentemente, pela produção de diferentes moléculas ativas e competição por espaço e nutrientes, reduzir ainda mais a população do patógeno.

Xue et al. (2015) observaram que em solo supressivo ao fungo *Foc* havia uma maior diversidade microbiana, sendo a família Streptomycetaceae uma das mais abundantes, bem como no trabalho de Mendes et al. (2011) em que foram comparados solos com diferentes níveis de supressão da doença causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* e observou que o filo Actinobacteria foi um dos mais abundantes. Chen et al. (2018) demonstrou o efeito do isolado *Streptomyces* sp. CB-75 na diminuição do índice da doença mal-do-Panamá em comparação ao controle, bem como no desenvolvimento da planta.

A AACPD ao longo das 8 avaliações deste trabalho, mostrou diferença entre os tratamentos, sendo as menores para os tratamentos CAB-C 12, CAB-C 24, CAB-C 25 e CAB-C 50. Assim, para estes tratamentos, a severidade da doença mantém-se de forma constante ao longo das avaliações, não apresentando um aumento progressivo quando comparado ao controle, o que reflete em um mecanismo de controle/supressão da doença interessante em relação aos demais inoculantes/tratamentos, que é de suma importância para a supressão de doenças policíclicas (Vale et al., 2004; Ploetz, 2015).

A observação dos sintomas externos da doença mal-do-Panamá é uma das formas de diagnosticar a doença em plantas de bananeira, contudo os valores de severidade podem não representar a verdadeira intensidade da doença, pois as plantas podem não exibir os sintomas externos prontamente após a infecção ou exibir um amarelecimento em decorrência do excesso de água e da deficiência nutricional, sendo fundamental a avaliação dos sintomas internos, o comprometimento do sistema vascular, que são sintomas mais precisos (Ribeiro et al., 2018). Neste trabalho, os sintomas internos corresponderam aos sintomas externos na maioria dos tratamentos, com os menores índices de incidência de doença os tratamentos CAB-C 21, CAB-C 24 e CAB-C 50, o que corrobora com a diferença entre os tratamentos e a eficiência dos tratamentos em relação à supressão da doença.

A bananeira, por ser perene (dada a característica de sucessão de plantas “filhas”), favorece ciclos contínuos da doença mal-do-Panamá, aumentando o acúmulo de inóculo nos bananais (Dita et al., 2018). A utilização de microrganismos benéficos para a agricultura, como os PGP e agentes de biocontrole, representam uma alternativa sustentável, ecologicamente correta em relação aos agroquímicos, além da fácil disponibilidade no ambiente, sendo as actinobactérias um grupo

abundante e importante na rizosfera e em composto orgânico, as quais podem e vem sendo isoladas e estudadas para a formulação e aplicação como bioinoculantes, uma vez que são microrganismos adaptados a este tipo de ambiente e altamente competitivas (Subramaniam et al., 2016; Yadav et al., 2017; Dita et al., 2018).

5. Conclusões

O presente estudo evidencia que alguns dos isolados do gênero *Streptomyces* ssp. testadas *in vitro* no capítulo 2 para o controle do fungo *Foc* em condições *in vitro*, também apresentam atividade *in vivo* para o controle do *Foc*, atuando na supressão da doença mal-do-Panamá, e, além disso, apresentam mecanismos não explorados neste estudo associados ao desenvolvimento da planta. Alguns isolados como o CAB-C 24, CAB-C 25 e CAB-C 50 mostraram atividade tanto isolados quanto empregados em consórcio (mix) com outras *Streptomyces* ssp., como observado pelos resultados do tratamento Mix na repetição do experimento. O(s) mecanismo(s) relacionados com PGP e biocontrole que estes isolados apresentam serão investigados para um melhor entendimento da atuação destes isolados no desenvolvimento da planta e supressão da doença. Dentre todos os isolados, a *Streptomyces* sp. CAB-C 50 e a *Streptomyces* sp. CAB-C12 são candidatos promissores para mais estudos e desenvolvimento/otimização de um bioinoculante com atividade de biocontrole e promoção do crescimento para bananeira da variedade Prata anã e, posteriores testes com outras variedades de bananeira, por apresentar efeito tanto para PGP de bananeira ‘Prata Anã’, quanto para a supressão da doença mal-do-Panamá, doença de grande importância da cultura.

6. Referências

- Aldesuquye, H., S., Mansour, F., A., Abo-Hamede, S., A., 1998. Effect of the Culture Filtrates of *Streptomyces* on Growth and Productivity of Wheat Plants. *Folia Microbiologica* 43 (5), 465-470.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* 35 (4), 1044-1051.
- Bérdy, J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites: A personal view. *The Journal of Antibiotics* 58 (1), 1-26.
- Bérdy, J., 2012. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiotics* 65, 385.
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., Köberl, M., 2016. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany* 67 (4), 995-1002.
- Bidabadi, S., Sijun, Z., 2018. Banana Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) Control and Resistance, in the Context of Developing Wilt-resistant Bananas Within Sustainable Production Systems. *Horticultural Plant Journal* 4 (5), 208-218.
- Borges, A., L., Nutrição, calagem e adubação. In.: Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde. In.: Lima, M., B., Silva, S., O., Ferreira, C., F., (Edit.). 2ª ed. Embrapa. Brasília – DF, p. 63-77, 2012.
- Borges, A., L., Silva, J., T., A., Oliveira, A., M., G., D'Oliveira, P., S., 2016. Nutrição e adubação. In: Ferreira, C., F., Silva, S., de, O., Amorim, E., P., Serejo, J., A., S., (Eds.), O agronegócio da banana. Embrapa, Brasília, DF, 547-575.
- Canal do Produtor, 2015. <http://www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/noticias/banana-e-fruta-mais-consumida-pelos-brasileiros-pais-produz-7-milhoes-de-tonela> (acessado em fevereiro de 2016).
- Chen, Y., Zhou, D., Qi, D., Gao, Z., Xie, J., Luo, Y., 2018. Growth Promotion and Disease Suppression Ability of a *Streptomyces* sp. CB-75 from Banana Rhizosphere Soil. *Front. Microbiol* 8, 2704. doi: 10.3389/fmicb.2017.02704.
- Cordeiro, Z., J., M., 1997. Variabilidade patogênica de isolados de *Mycosphaerella musicola* e resistência induzida e genética em genótipos de bananeira. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – SP. 118 f.
- Cordeiro, Z., J., M., Matos, A., P., 2012. Doenças. In.: Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde. In.: Lima, M., B., Silva, S., O., Ferreira, C., F., (Edit.). 2ª ed Embrapa. Brasília – DF, 125-150.
- Cordeiro, Z., J., M., Matos, A., P., Haddad, F., 2016. Doenças fúngicas e bacterianas. In: Ferreira, C., F., Silva, S., de, O., Amorim, E., P., Serejo, J., A., S., (Eds.), O agronegócio da banana. Embrapa, Brasília, DF, 547-575.
- Desa (Department of Economic and Social Affairs), 2017. Population Division World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP/248. United Nations, New York.
- Dias, M., Bastos, M., Xavier, V., Cassel, E., Astarita, L., Santarém, E., 2017. Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant Physiol Bioch* 118, 479-493.

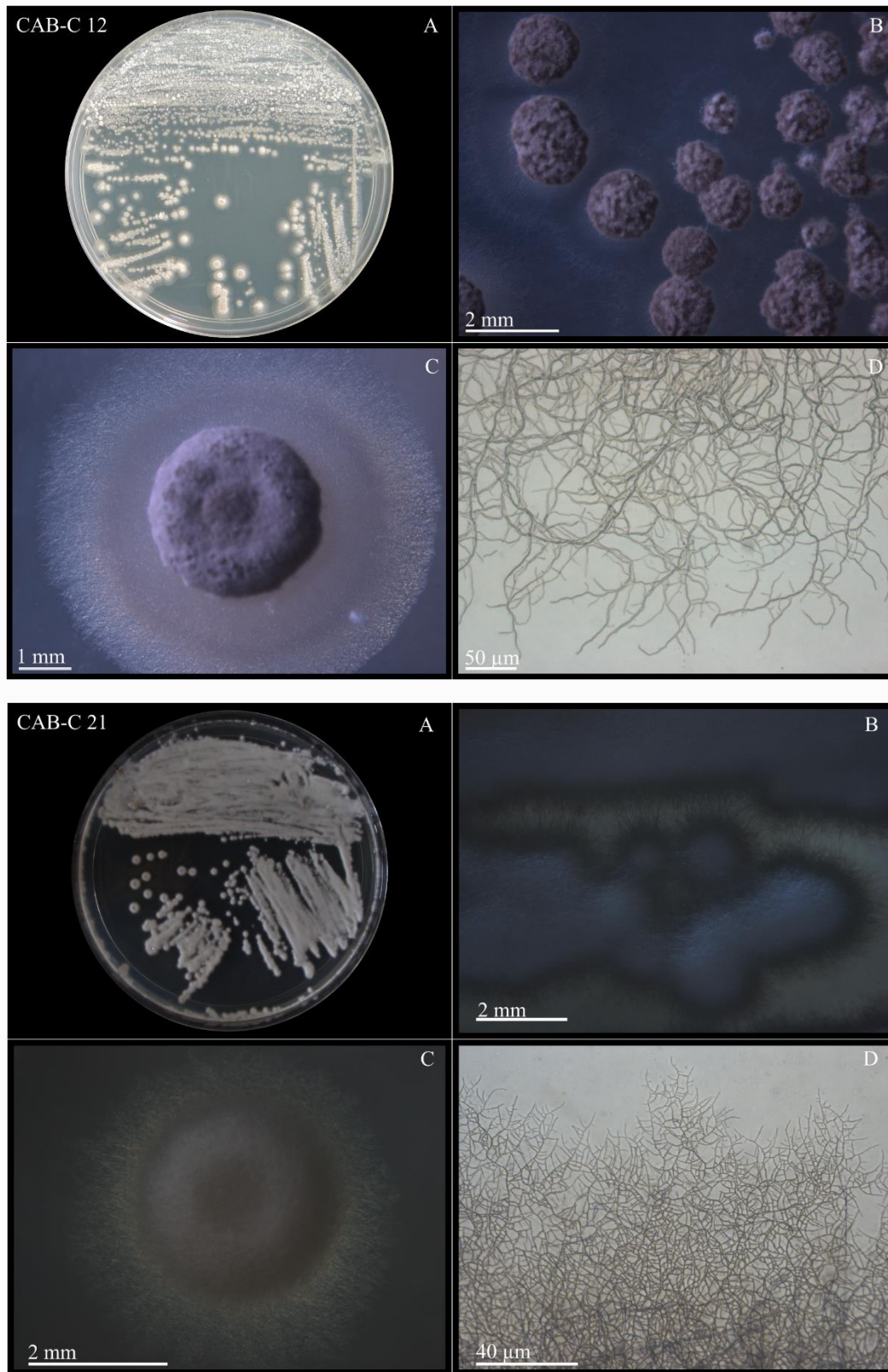
- Dita, M., A., Haddad, F., 2018(a). Raça 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*: subsídios para caracterização de praga quarentenária ausente / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/SDA, 37p.
- Dita, M., A., Pérez-Vicente, L., Martínez De La Parte, E., 2014. Inoculation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causal agent of *fusarium* wilt in banana. In: PÉREZ-VICENTE, L., DITA M.A., MARTINEZ-DE LA PARTE. E. Technical Manual: Prevention and diagnostic of *Fusarium* Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4), 74p.
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E., S., G., Staver, C., P., 2018. *Fusarium* Wilt of Banana: Current Knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in Plant Science* 9 (1468).
- Du, X., Zhai, Y., Deng, Q., Tan, H., Cao, L., 2018. Illumina-Based Sequencing Analysis Directed Selection for Actinobacterial Probiotic Candidates for Banana Plants. *Probiotics Antimicro* 10, 284–292.
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C., 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol* 46, 387–400
- El-Tarabily, K., A., 2008. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil* 308, 161–174.
- Fao, 2017. The State Of Food And Agriculture: Leveraging Food Systems For Inclusive Rural Transformation. Rome - Italy, FAO.
- Faostat, 2018a. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/GY/visualize> (acessado em dezembro de 2018).
- Faostat, 2018a. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (acessado em dezembro de 2018).
- Faostat, 2018b. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize> (acessado em dezembro de 2018).
- Ferrera, C., M., Olivetea, J., E., Oriasa, S., L., Rocasa, M., R., Juana, C., S., Dungcaa, J., Z., Mahboobb, T., Barusruxb, S., Nissapatornb, V., 2018. A Review on *Streptomyces* spp. as Plant-Growth Promoting Bacteria (PGPB). *Asian Journal Of Pharmacognosy* 2(3), 32-40.
- Fisher, M., Hawkins, N., Sanglard, D., Gurr, S., 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* 360, 739–742.
- Franco-Correa, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodríguez, M., Barea, J.-M., 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* 45, 209–217.
- Glick, B., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *Fems Microbiol Lett* 251, 1–7.
- Glick, B., R., 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 1-15. Doi: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.
- Hamed, J., Mohammadipanah, F., 2015. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *J Ind Microbiol Biot* 42, 157–171.

- Han, D., Wang, L., Luo, Y., 2018. Isolation, identification, and the growth promoting effects of two antagonistic actinomycete strains from the rhizosphere of *Mikania micrantha* Kunth. *Microbiol Res* 208, 1-11.
- Haney, C., H., Samuel, B., S., Bush, J., Ausubel, F., M., 2015. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nature Plants*, 1-9. DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.51.
- Javaid, M., Sultan, S., 2013. Plant growth promotion traits and Cr (VI) reduction potentials of Cr (VI) resistant *Streptomyces* strains. *J Basic Microb* 53, 420–428.
- Jeger, M., Viljanen-Rollinson, S., 2001. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theor Appl Genet* 102, 32–40.
- Johnson, K., 2010. Pathogen Refuge: A Key to Understanding Biological Control. *Annu Rev Phytopathol* 48, 141–160.
- Kemung, H., M., Tan, L., T., Khan, T., M., Chan, K., Pusparajah, P., Goh, B., Lee, L., 2018. *Streptomyces* as a Prominent Resource of Future Anti-MRSA Drugs. *Front. Microbiol.* 9, 2221.
- Lpsn, 2018. <http://www.bacterio.net/streptomyces.html> (acessado em dezembro de 2018).
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H., Trujillo, M. E., Kampfer, P. Whitman, W. B., 2012. Road map of the phylum Actinobacteria. In: Goodfellow, M. et al. (Edit.). *BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology. The Actinobactéria, Part A. 2ª ed.* Springer 5, 01-2031
- Ma, L.-J., Geiser, D., Proctor, R., Rooney, A., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D., Manners, J., Kazan, K., 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Microbiology+* 67, 399–416.
- McGuire, R., G., 1992. Reporting of Objective Color Measurements. *Hortscience* 27(12), 1254-1260.
- McKinney, R., H., 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 6, 195-218.
- Mendes, R., Kruijt, M., Bruijn, I., Dekkers, E., Voort, M., Schneider, J., Piceno, Y., DeSantis, T., Andersen, G., Bakker, P., Raaijmakers, J., 2011. Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science* 332, 1097–1100.
- Michielse, C., Rep, M., 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 10, 311–324.
- Ntalli, N., G., Menkissoglu-Spiroudi, U., 2011. Pesticides of Botanical Origin: A Promising Tool in Plant Protection. Intechopen: Pesticides - Formulations, Effects, Fate. <https://www.intechopen.com/books/pesticides-formulations-effects-fate/pesticides-of-botanical-origin-a-promising-tool-in-plant-protection>. DOI: 10.5772/13776.
- Ohike, T., Matsukawa, T., Okanami, M., Kajiyama, S., Ano, T., 2018. Biological Control Potential of *Streptomyces* sp. AR10 Producing Albocycline Isolated from Soil around Ant Nest. *J Agr Sci* 10, 54.
- Ohike, T., Matsukawa, T., Okanami, M., Kajiyama, S., Ano, T., 2018. Biological Control Potential of *Streptomyces* sp. AR10 Producing Albocycline Isolated from Soil around Ant Nest. *J Agr Sci* 10, 54.

- Olanrewaju, O., Babalola, O., 2018. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Appl Microbiol Biot* 103, 1–10.
- Orozco-Mosqueda, M., Rocha-Granados, M., Glick, B., Santoyo, G., 2018. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiol Res*.
- Orr, R., Nelson, P., N., 2018. Impacts of soil abiotic attributes on Fusarium wilt, Focusing on bananas. *Applied Soil Ecology* 132, 20–33.
- Palaniyandi, S., Yang, S., Zhang, L., Suh, J.-W., 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 9621–9636.
- Panamá Disease, 2016. <http://panamadisease.org/> (acessado em fevereiro de 2016).
- Philippot, L., Raaijmakers, J., Lemanceau, P., Putten, W., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 11, 789–799.
- Pietro, A., Madrid, M., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., Roncero, M., 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol* 4, 315–325.
- Ploetz, R., 2015. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Prot* 73, 7–15.
- Ploetz, R., Kema, G., Ma, L.-J., 2015(a). Impact of Diseases on Export and Smallholder Production of Banana. *Annu Rev Phytopathol* 53, 1–20.
- Promusa, 2018. <http://www.promusa.org/Banana-producing+countries+portal#footnote1> (acessado em janeiro de 2019).
- Qin, S., Miao, Q., Feng, W.-W., Wang, Y., Zhu, X., Xing, K., Jiang, J.-H., 2015. Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. *Appl Soil Ecol* 93, 47–55.
- Rebouças, T., Haddad, F., Ferreira, C., Oliveira, S., Ledo, C., Amorim, E., 2018. Identification of banana genotypes resistant to *Fusarium* wilt race 1 under field and greenhouse conditions. *Sci Hortic-amsterdam* 239.
- Reinhold-Hurek, B., Bonger, W., Burbano, C., S., Sabale, M., Hurek, T., 2015. Roots shaping their microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annual Review of Phytopathology* 53 (1), 403-424.
- Ribeiro, L., Silva, S., Oliveira, S., Amorim, E., Serejo, J., Haddad, F., 2018. SOURCES OF RESISTANCE TO *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* IN BANANA GERMPLASM. *Rev Bras Frutic* 40.
- Rodrigues, M., A., D., Ribeiro, L., Amorim, E., P., Cordeiro, Z., J., M., Silva, S., O., 2011. Metodologia para a caracterização de genótipos de bananeira quanto à resistência ao mal-do-Panamá em casa-de-vegetação. *Comunicado Técnico* 150, Embrapa, 1-5.
- Siddikee, M., 2010. Isolation, Characterization, and Use for Plant Growth Promotion Under Salt Stress, of ACC Deaminase-Producing Halotolerant Bacteria Derived from Coastal Soil. *J Microbiol Biotechnol* 20, 1577–1584.

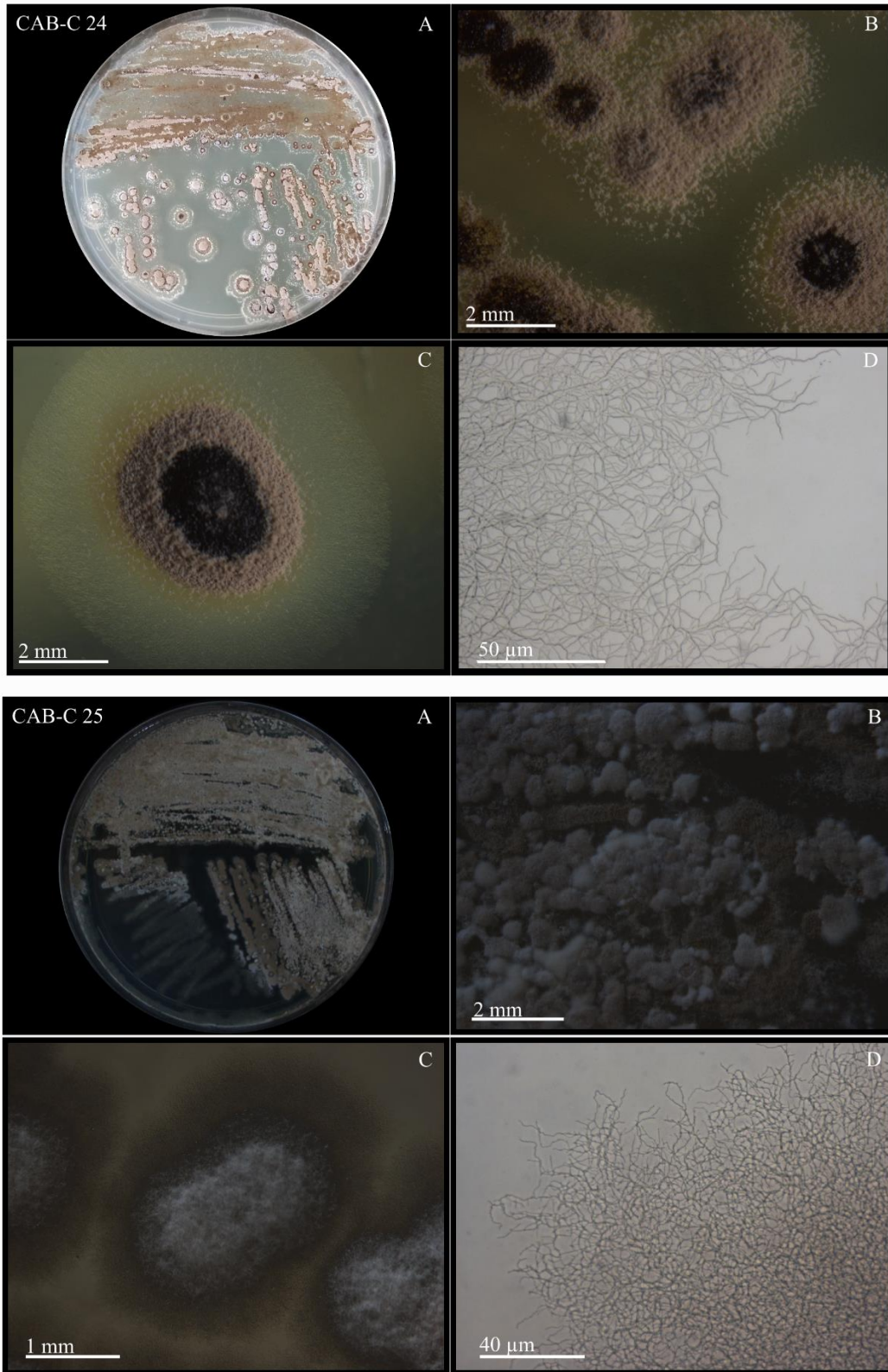
- Silva, S., O., Amorim, E., P., Serejo, J., A., S., Borges, A., L., 2016. Cultivares. In: Ferreira, C., F., Silva, S., de, O., Amorim, E., P., Serejo, J., A., S., (Eds.), O agronegócio da banana. Embrapa, Brasília, DF, 137–170.
- Sousa, J., Olivares, F., 2016. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chem Biological Technologies Agric* 3, 24.
- Steinauer, K., Chatzinotas, A., Eisenhauer, N., 2016. Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? *Ecol Evol* 6, 7387–7396.
- Stover, R. H., 1962 Fusarial Wilt (Panama Disease) of Bananas and other *Musa* species. *Transactions of the British Mycological Society* 45 (4), 589-595.
- Subramaniam G., Arumugam, S., Rajendran, V., 2016. Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes, DOI 10.1007/978-981-10-0707-1_1.
- Vale, F. X., R., Jesus Junior, W., C., Zambolim, L., 2004. *Epidemiologia Aplicada no Manejo de Doenças de Plantas*. Belo Horizonte, MG: Editora Perfil 1, 532p.
- Vurukonda, S., S., K., P., Giovanardi, D., Stefani, E., 2018 Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (952), 1-26.
- Wairegi, L.W.I., Asten, P.J.A., 2010. The agronomic and economic benefits of fertilizer and mulch use in highland banana systems in Uganda. *Agr Syst* 103, 543–550.
- Waksman, S., A., Henrici, A., T., 1943. The Nomenclature And Classification Of The Actinomycetes. 337-341.
- Wang, B., Yuan, J., Zhang, J., Shen, Z., Zhang, M., Li, R., Ruan, Y., Shen, Q., 2013. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. *Biol Fert Soils* 49, 435–446.
- Xue, C., Penton, C., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., Ruan, Y., Shen, Q., 2015. Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Sci Rep-uk* 5, 11124.
- Yadav, A., 2017. Plant Microbiomes and Its Beneficial Multifunctional Plant Growth Promoting Attributes. *Int J Environ Sci Nat Resour* 3
- Zhang, N., Wu, K., He, X., Li, S., Zhang, Z., Shen, B., Yang, X., Zhang, R., Huang, Q., Shen, Q., 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant Soil* 344, 87–97.
- Zhang, N., Wu, K., He, X., Li, S., Zhang, Z., Shen, B., Yang, X., Zhang, R., Huang, Q., Shen, Q., 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant Soil* 344, 87–97.
- Zhao, M., Yuan, J., Zhang, R., Dong, M., Deng, X., Zhu, C., Li, R., Shen, Q., 2018. Microflora that harbor the NRPS gene are responsible for *Fusarium* wilt disease-suppressive soil. *Appl Soil Ecol* 132.

7. Apêndices



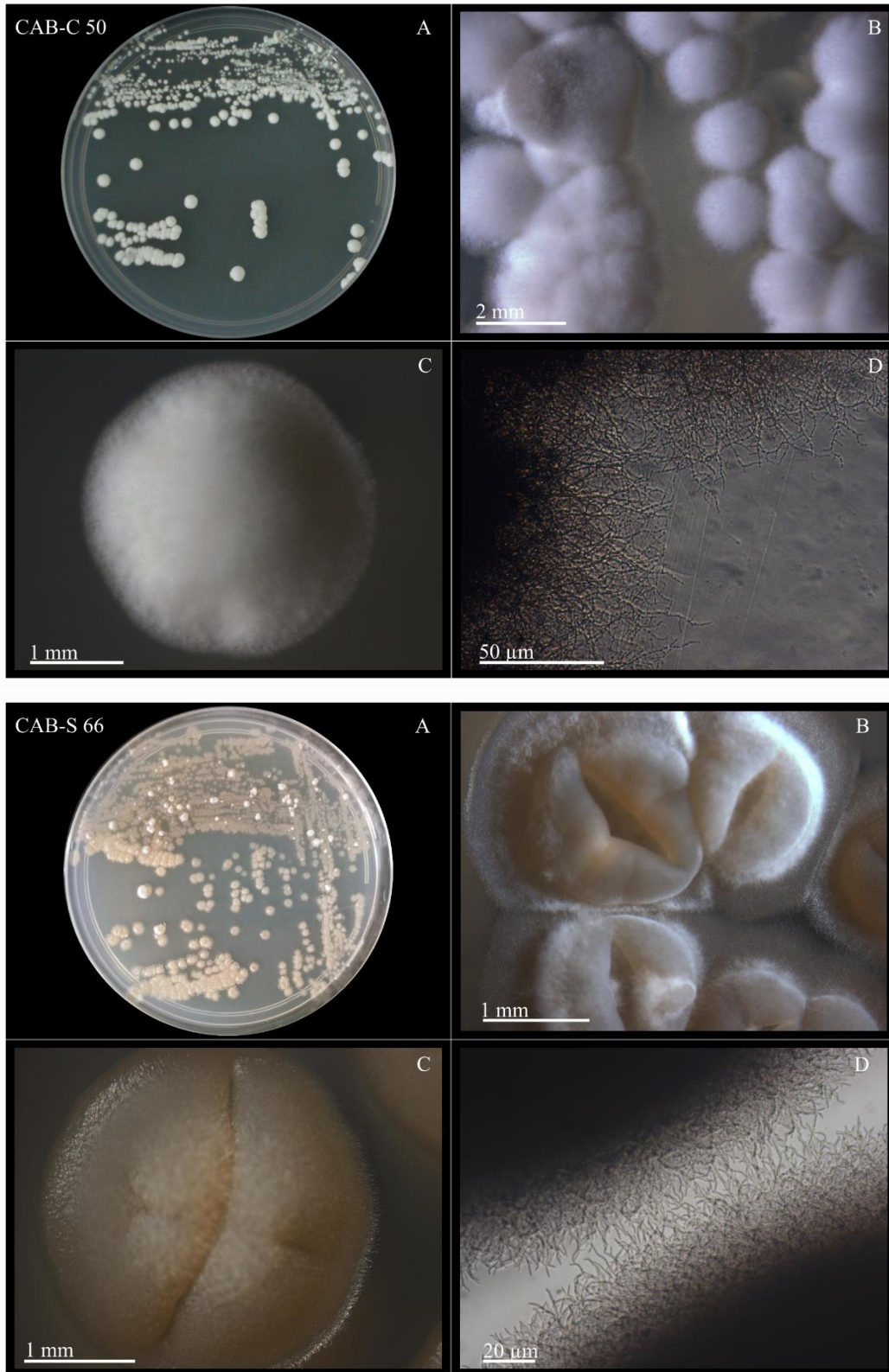
Continua...

Continuação:



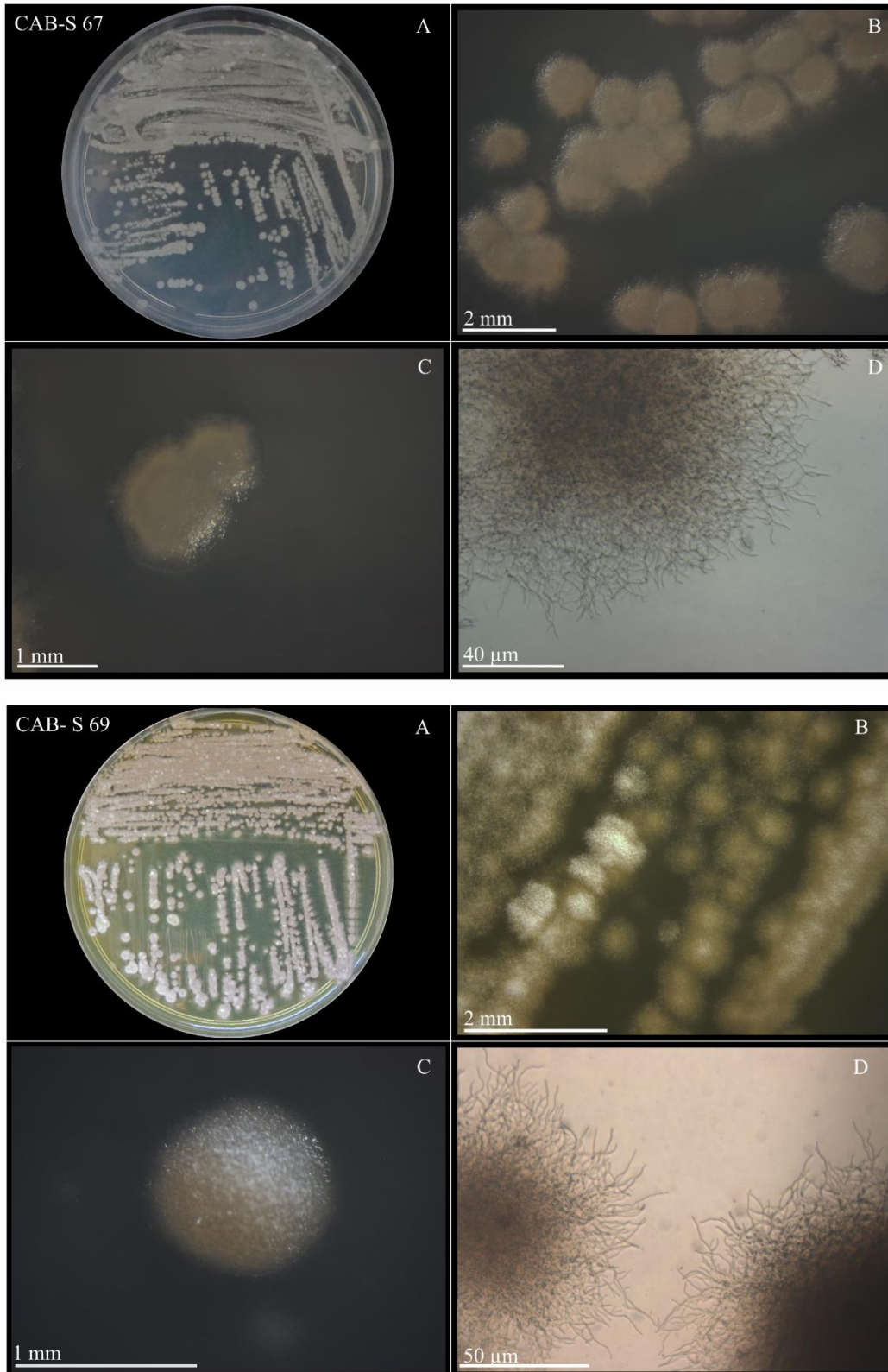
Continua...

Continuação:



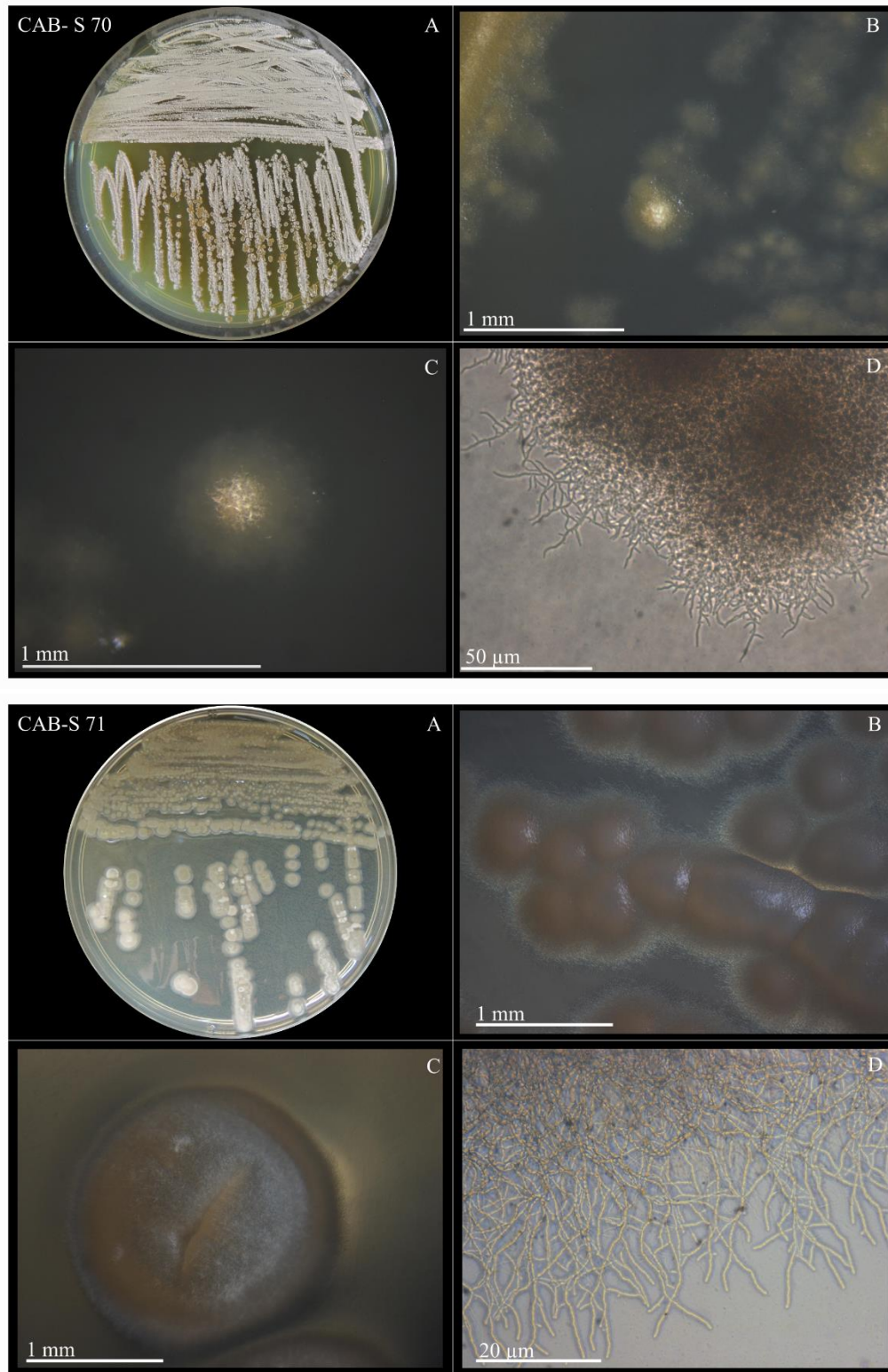
Continua...

Continuação:



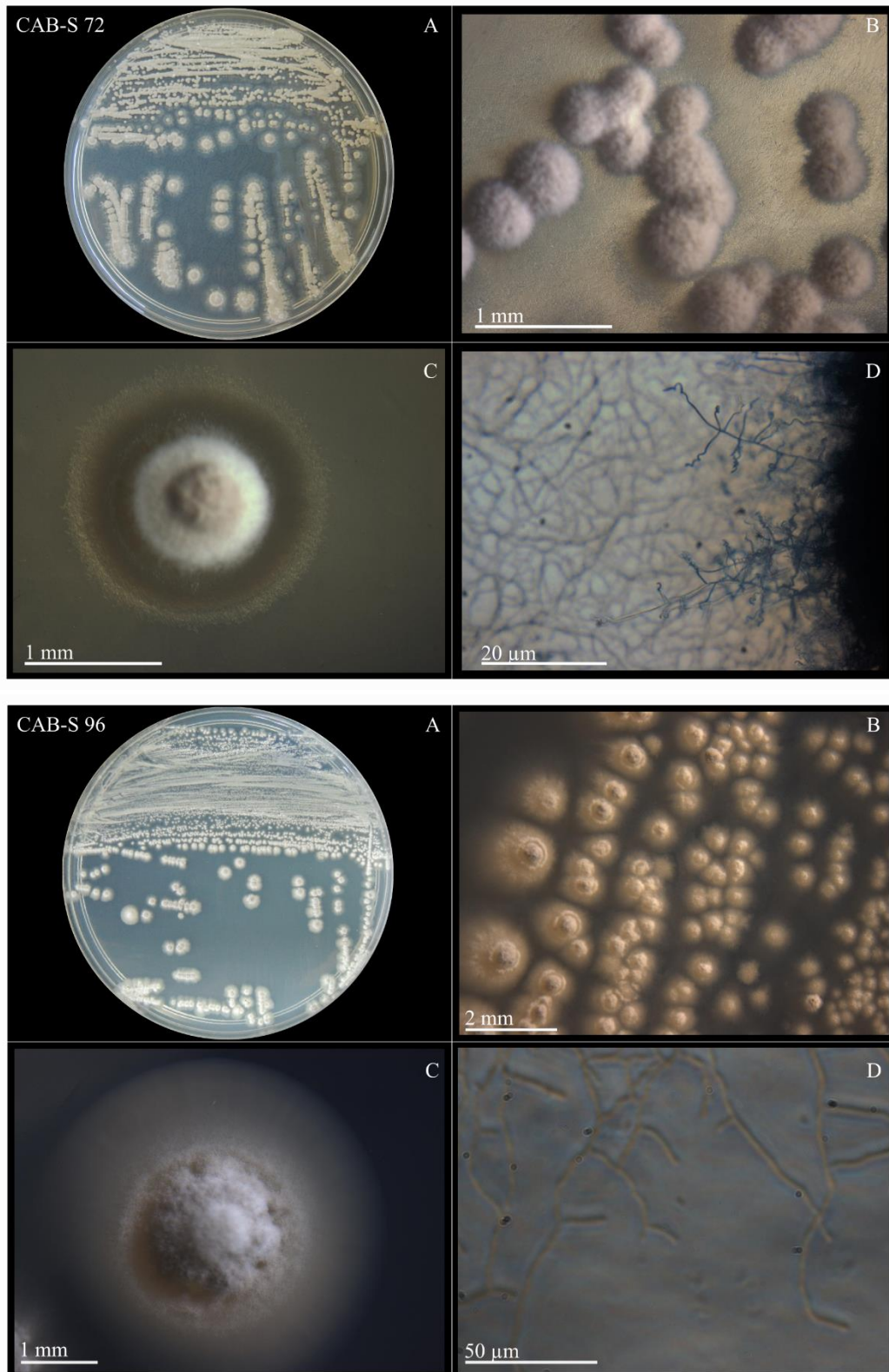
Continua...

Continuação:



Continua...

Continuação:



Apêndice A - Características morfológicas e culturais dos 12 isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Imagens obtidas com auxílio de microscópio estereoscópio lupa (Olympus SZ61)

(imagens B e C) e microscópio invertido (Olympus IX70) (imagem D). A: Isolado cultivado em placa de *Petri* plástica 90 x 15 mm em meio de cultura BDA. B: Aspecto cultural do isolado em maior aumento. C: Aspecto de uma colônia isolada. D: Aspecto do micélio do isolado. Imagens obtidas com sete dias de cultivo do isolado.

Apêndice B - Resultado da análise do solo e do substrato utilizado neste trabalho para o plantio das mudas de bananeira da variedade Prata anã.

	Solo	Substrato
N(mg/dm ³)	-	12500
P (mg/dm ³)	66.7	3900
K(mg/dm ³)	230	14400
Ca(mg/dm ³)	-	24000
Mg(mg/dm ³)	-	4400
S(mg/dm ³)	-	2500
CO(mg/dm ³)	-	347800
Na (mg/dm ³)	-	630
C/N	-	28.27
Zn (mg/dm ³)	2.9	55
Fe (mg/dm ³)	85.8	2931
Mn (mg/dm ³)	16.4	156
Cu (mg/dm ³)	0.5	25
B (mg/dm ³)	0.1	39.2
pH (H ₂ O)	6.3	6.44
Umidade (%)	Ar	36.54
	Estufa (75 °C)	46.80
Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³)	2.5	-
Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³)	0.9	-
Al ³⁺ (cmol _c /dm ³)	0	-
H+AL (cmol _c /dm ³)	2.80	-
SB (cmol _c /dm ³)	4	-
CTC(t) (cmol _c /dm ³)	4	-
V (%)	59	-
MO (%)	2.25	-
P-rem (mg/L)	27.3	-

N = nitrogênio; P = fósforo; K = potássio; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio; S = enxofre; CO = carbono orgânico; C/N = relação carbono nitrogênio; Zn = zinco; Fe = ferro; Mn = manganês; Cu = cobre; B = boro; Na = sódio; H + Al = hidrogênio mais alumínio; SB = soma de bases trocáveis; CTC (t) = Capacidade de troca catiônica efetiva; V = Índice de saturação de bases; MO = matéria orgânica; P-rem = fósforo remanescente.

Conclusões Gerais

- Há diferença na composição e abundância de comunidades microbianas nas amostras de solo sob cultivo de bananeira nas áreas estudadas nos Estados da Bahia e do Ceará e nas diferentes fases do sistema de compostagem, sendo mais evidentes nas fases da compostagem.
- O composto orgânico maduro (fase IV da compostagem), o qual é aplicado nas áreas de plantio de bananeira da Empresa Sítio Barreiras LTDA, apresenta microrganismos com potencial de biocontrole de microrganismos patogênicos e, não foi detectada a presença do gênero *Fusarium*, gênero do agente causal (*Foc*) da doença mal-do-Panamá, responsável por significativos prejuízos à cultura da bananeira.
- Os isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces* obtidos de amostras de solo sob cultivo de bananeira e do composto orgânico, bem como os compostos produzidos por estes isolados, apresentam atividade antimicrobiana contra fungos filamentosos (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Colletotrichum lindemuthianum*) levedura (*Candida albicans*) e bactérias Gram negativa (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) e Gram positiva (*Staphylococcus aureus*).
- Os isolados CAB-C 12 e CAB-C 50 são promissores para o controle da doença mal-do-Panamá em condições de casa de vegetação, os quais devem ser testados em condições de campo, bem como para a promoção do crescimento vegetal de bananeira da variedade Prata anã.
- Dentre os isolados da Coleção de Actinobacterias do laboratório de Genética Molecular de Bactérias há isolados que produzem substâncias que podem ser utilizadas para o controle de fungos e bactérias patogênicas, bem como com potencial para promover o crescimento de mudas de bananeira da variedade Prata Anã.